

DAYA REGENERASI KALUS EKSPLAN EMBRIO KEDELAI (*Glycine max L.*) PADA BERBAGAI KONSENTRASI HORMON TUMBUH 2,4 D DAN BAP SECARA IN VITRO

*(Regeneration Power of The Embryo Explants Callus Soybean (*Glycine Max L.*) at Various Concentrations Growth Hormones of 2.4 D And Bap In Vitro)*

Asriyanto Arsyam^{*1}, Abdullah², Netty S. Said³

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar.

^{2,3}Dosen Program Studi Agroteknologi Universitas Muslim Indonesia, Makassar

e-mail: ¹tmurfira@gmail.com, ²abdullah.abdullah@umi.ac.id, ³nettysyam@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this study is to determine the regeneration power of soybean embryo explants callus at various concentrations of 2,4 D growth hormones and BAP in vitro. This study was conducted at the Laboratory of Bio-Science and Plant Reproduction Biotechnology, Department of Agricultural Cultivation, Faculty of Agriculture, Hasanuddin University (UNHAS), Makassar, from December 2019 to February 2020. Data were analyzed using analysis of variance, BNJ 5%. The results showed that the growth regulator 2,4 D (auxin) had no significant effect on the time and the percentage of callus formation, but had a significant effect on the callus weight and callus color, which resulted in a concentration of 2.4 D between 8 ppm - 10 ppm and better callus color. BAP growth agent (cytokinin) singly had no significant effect on the time and proportion of soybean embryo callus explants, but giving 1.0 ppm of BAP concentration had a significant effect and could improve callus color quality, while 2.0 ppm of BAP could increase callus weight. The combination of growth regulators 2.4 D 10 ppm and BAP 2 ppm produced better callus wet weight, that is 3.35 grams. While the combination of D 8 ppm and BAP 1 ppm produced better callus color, that is in the category between whitish green and green.

Keywords: Chili Plant, Nitrogen and Potassium Fertilizers

PENDAHULUAN

Tanaman kedelai (*Glycine max L.*) merupakan salah satu tanaman multiguna karena dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan, pakan ternak maupun bahan baku berbagai industri dan olahan. Tanaman ini mempunyai peranan cukup besar dalam memenuhi kebutuhan gizi masyarakat, terutama sebagai sumber protein nabati yang bermutu tinggi (Muchtadi, 2009). Permintaan kebutuhan kedelai untuk konsumsi, makanan ternak (pakan) dan bahan baku industri dari tahun ke tahun terus meningkat.. Kebutuhan komoditas kedelai dalam negeri, menurut hasil Survei Badan Pusat Statistika 2017, mencapai 3,10 juta ton

kedelai biji kering atau setara 11,89 kilogram per kapita dan lebih tinggi dibandingkan tahun 2015, yaitu sebesar 15,63 %. Kebutuhan komoditas kedelai tersebut tidak sebanding dengan kemampuan produksi kedelai dalam negeri dan hanya dapat terpenuhi kurang lebih 963.000 ton kedelai biji kering atau 30% dari total kebutuhan kedelai nasional (BPS, 2017).

Dalam rangka pemenuhan kebutuhan kedelai di Indonesia, upaya peningkatan produktivitas dan pengembangan lahan-lahan marginal perlu terus digalakkan, karena lahan subur mulai berkurang. Indonesia memiliki luasan lahan marginal sekitar 104 juta hektar yang mencakup 68%

dari total luasan lahan pertanian yaitu 148 juta Ha (Balittanah, 2018). Pengembangan kultivar unggul kedelai dapat dirakit melalui perbaikan genetik, baik melalui persilangan konvensional maupun pendekatan teknik kultur *in vitro* atau bioteknologi. Upaya pengembangan kedelai untuk tahan salinitas melalui pemuliaan secara konvensional memerlukan waktu lebih lama dan kemajuan seleksi lebih lambat. Hal itu dapat diatasi dengan penerapan pemuliaan secara bioteknologi yakni seleksi somaklonal pada tingkat sel dan jaringan (kalus) secara *in vitro* (Syukur, 2012). Kedua metode ini juga dapat saling mendukung dalam penciptaan varietas baru.

Seleksi secara *in vitro* sangat mungkin dilakukan disebabkan adanya fenomena keragaman somaklonal, yaitu keragaman genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur sel atau kalus. Perakitan varietas secara kultur jaringan diawali dengan pembentukan kalus, karena pada dasarnya kalus mengandung sel yang aktif membelah dan memiliki potensi morfogenik tinggi (Armini, et al, 1991). Namun demikian, pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan yang

digunakan. Menurut Evans, Sharp dan Flick (1981) eksplan yang dapat beregenerasi dengan baik adalah kotiledon, hipokotil, batang, daun, pucuk tunas, akar, kuncup bunga, petal, tangkai daun, jaringan ovul atau embrio.

Pembentukan kalus dari suatu eksplan dalam kultur jaringan, menurut Andaryani (2010) selain ditentukan oleh sumber eksplan, juga komposisi nutrisi pada media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan. Menurut Evans *et al* (2003) dalam Hayati (2010), induksi kalus dipengaruhi oleh rasio auksin dan sitokinin, sehingga diperlukan kombinasi yang tepat untuk menginduksi pembentukan kalus secara optimal.

Daya regenerasi suatu kalus sangat penting untuk menjamin keberhasilan pada kultur kalus. Hal tersebut dipengaruhi oleh umur kalus, genotipe, sumber eksplan dan kondisi kultur termasuk lingkungan dan media kultur yang digunakan. Daya regenerasi suatu kalus akan menurun, bahkan menghilang seiring dengan lamanya periode kultur kalus (Fiah *et al.*, 2014).

(sitokinin) yang dapat meningkatkan daya regenerasi kalus eksplan embrio kedelai secara *in vitro*, dan kegunaan penelitian ini yaitu melihat daya regenerasi eksplan embrio kedelai pada berbagai hormon tumbuh 2,4 D dan BAP yang ditanam dalam media B5 (Gamborg).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di

Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4 D (auksin) yang tepat terhadap daya regenerasi kalus eksplan embrio kedelai secara *in vitro*, mengetahui konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP (sitokinin) yang tepat terhadap daya regenerasi kalus eksplan embrio kedelai secara *in vitro*, mengetahui kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D (auksin) dan BAP

Laboratorium Bio-Sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin (UNHAS), Makassar. Pada bulan Desember 2019 sampai Februari 2020.

Bahan dan Alat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bio-Sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin (UNHAS), Makassar. Pada bulan Desember 2019 sampai Februari 2020.

Bahan eksplan yang digunakan adalah embrio kedelai, media B5, BAP dan 2,4-D, agar, gula pasir, aquades steril, alkohol 70 %, alkohol 96%, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, dithane, betadine, detergen, spritus dan NaClO (Bayclin). Alat yang digunakan yaitu autoklaf, magnetik stirrer, sendok pengaduk, gelas ukur, pipet, gelas beker, aluminium foil, timbangan analitik, pH meter atau kertas lakmus, botol kultur, plastik tahan panas, karet, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), bunsen, gunting, pinset, skapel, blade, tissu, plastik wrap, cawan petri, korek api, rak kultur dan kertas label.

Metode Penelitian

Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dua faktor. Faktor pertama: hormon tumbuh BAP (B) yang terdiri atas 4 taraf yaitu: B1= 0 ppm, B2= 1,0 ppm, B3= 1,5 ppm, B4= 2,0 ppm. Faktor kedua: hormon tumbuh 2,4-D (D) yang terdiri atas 4 taraf yaitu: D1 = 8 ppm, D2= 10 ppm, D3= 12 ppm, D4= 14 ppm.

Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh 16 kombinasi perlakuan dan setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali, sehingga terdapat 64 satuan percobaan. Pelaksanaan penelitian meliputi sterilisasi alat, pembuatan larutan stok dan media, inkubasi media, sterilisasi ruang kerja, sterilisasi eksplan, penanaman eksplan dan pemeliharaan.

Parameter pengamatan : (1) Waktu munculnya kalus (hst), diamati setelah terlihat adanya kumpulan sel (kalus) yang terbentuk pada eksplan. (2) Persentase eksplan membentuk kalus (%) diamati pada akhir pengamatan. (3) Berat basah kalus (g). Pengamatan dilakukan di awal dan akhir penelitian. Penimbangan dilakukan pada awal penelitian setelah penanaman eksplan dalam media dan pengamatan terakhir dengan menimbang botol kultur yang telah berkalus. Berat basah kalus dihitung dengan rumus:

$$BBK = BAK - BAW$$

BBK = Berat Basah Kalus

BAK = Berat Akhir

BAW = Berat Awal

Warna kalus, diamati pada awal dan akhir pengamatan melalui pemberian skor atau bobot berdasarkan warna yang ada pada kalus. Menurut kadir (2006) pengamatan warna kalus dapat dibedakan sebagai berikut:

- | | |
|----------------------------|----------------|
| 1. h (hijau) | = Skor 7 |
| 2. h/k (hijau keputihan) | = Skor 6 |
| 3. p/pp (putih) | = Skor 5 |
| 4. p/k (putih kekuningan) | = Skor 4 |
| 5. k/c (kuning kecoklatan) | = Skor 3 |
| 6. c/h (coklat kehitaman) | = Skor 2 |
| 7. h/m (hitam atau mati) | = Skor 1 dan 0 |

HASIL DAN PEMBAHASAN

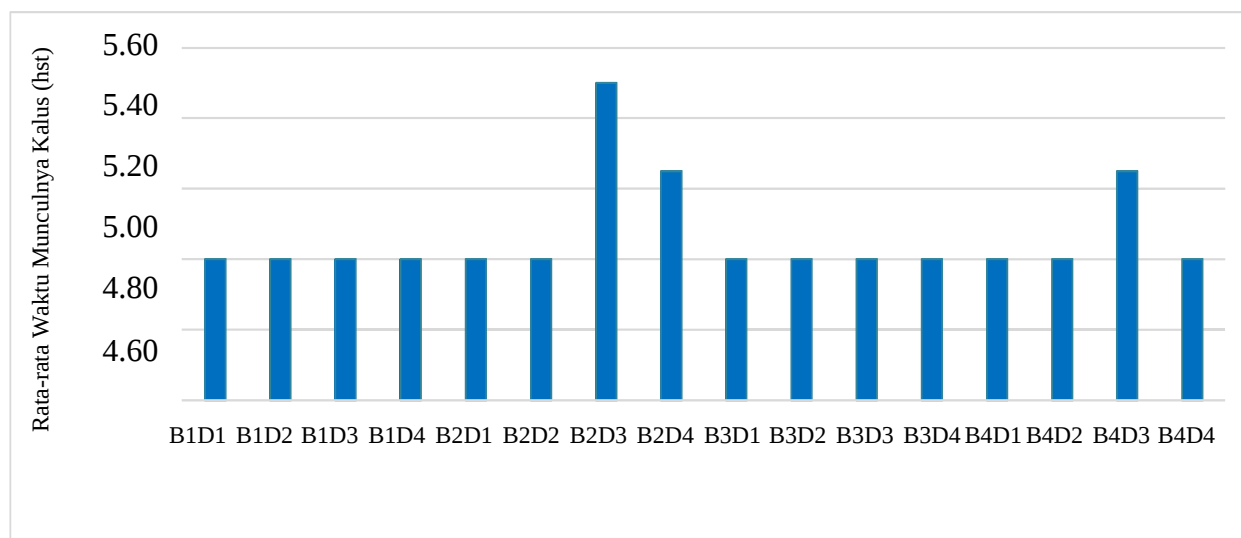
1. Tinggi Tanaman (cm)

a. Waktu Munculnya Kalus (hst)

Hasil pengamatan rata-rata waktu munculnya kalus pada embrio kedelai dari berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D menunjukkan bahwa perlakuan zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D serta kombinasinya berpengaruh tidak nyata.

Persentase waktu munculnya kalus pada embrio kedelai (Gambar 1) dari berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D menunjukkan bahwa pembentukan kalus secara umum rata-rata pada hari ke-5 setelah inokulasi. Namun demikian, ada kecenderungan waktu munculnya kalus pada perlakuan

BAP 1 ppm dan 2,4 D 12 ppm lebih lambat (5,50 hari) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Kalus akan mulai terbentuk dari bagian pelukaan eksplan atau bagian tepi irisan eksplan, karena kalus merupakan jaringan penutup luka yang bersifat meristematis. Hal ini juga dimungkinkan karena adanya salah satu bentuk respon tumbuhan terhadap terjadinya pelukaan pada jaringan ataupun selnya. Eksplan embrio kedelai memiliki persentase eksplan membentuk kalus yang tinggi. Hal ini diperlihatkan pada hasil penelitian dari 16 kombinasi perlakuan semuanya membentuk kalus. Kemampuan eksplan dalam membentuk kalus, selain akibat pengaruh ZPT endogen juga dipengaruhi oleh genotip eksplan, umur eksplan, lingkungan kultur, dan koresponsifan masing-masing eksplan (Zulkarnain 2009).



Gambar 1. Diagram Batang Rata-rata Waktu Munculnya Kalus (hst) pada Embrio Kedelai dari Berbagai Kombinasi 2,4 D dan BAP yang diinduksi Secara *In Vitro*

2. Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Hasil pengamatan persentase eksplan

embrio membentuk kalus pada berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D

menunjukkan bahwa semua eksplan yang ditanam dapat membentuk kalus (100% berkalus). Eksplan yang digunakan dalam penelitian yaitu embrio dari kedelai, embrio memiliki jaringan yang aktif membelah (meristem) dan jaringan muda sehingga

mempercepat regenerasi sel untuk membentuk kalus. Chawla (2003) menyatakan bahwa eksplan yang berasal dari jaringan muda dan sehat, umumnya lebih responsif dalam kultur jaringan sehingga proses regenerasi sel dapat berlangsung.

Tabel 3. Persentase Ekplan Embrio Membentuk Kalus (%) pada Berbagai Kombinasi 2,4 D dan BAP yang diinduksi Secara *In Vitro*

BAP (B) (ppm)	2,4-D (D) (ppm)				Rata-rata
	D1 (8)	D2 (10)	D3 (12)	D4 (14)	
B1 (0)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
B2 (1,0)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
B3 (1,5)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
B4 (2,0)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Rata-rata	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

3. Berat Buah Perpetak (g)

Hasil pengamatan berat basah kalus eksplan embrio kedelai pada berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D. Menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D berpengaruh nyata pada uji F 0,05, sedangkan kombinasi antara 2,4 D dan BAP berpengaruh nyata. Hasil uji BNJ (5 %) pada Tabel 4 menunjukkan bahwa berat basah kalus tertinggi terjadi pada perlakuan kombinasi BAP 2 ppm dengan penambahan 2,4 D 10 ppm (B4D2) yaitu 3,35 gram dan berbeda nyata dengan perlakuan kombinasi BAP 1 ppm dengan penambahan 2,4 D 14 ppm

dan kombinasi BAP 1 ppm dengan penambahan 2,4 D 10 ppm. Namun, berbeda tidak nyata dengan perlakuan lainnya. Berat basah kalus pada eksplan embrio kedelai dipengaruhi oleh kombinasi antara zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D. Berat basah kalus tertinggi (3,35 g) yaitu pada perlakuan BAP dengan konsentrasi 2,0 ppm dan penambahan 2,4 D 10 ppm. Berat basah kalus yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Andaryani,2010).

Tabel 4. Rata-rata Berat Basah Kalus (g) pada Berbagai Kombinasi 2,4 D dan BAP yang Diinduksi Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rata-rata	NP BNJ 5%
B1D1	2.74 _{ab}	0.74
B1D2	2.98 _a	
B1D3	2.81 _a	
B1D4	2.80 _{ab}	
B2D1	3.09 _a	
B2D2	2.52 _b	
B2D3	2.70 _{ab}	
B2D4	2.05 _b	
B3D1	2.84 _a	
B3D2	2.98 _a	
B3D3	2.82 _a	
B3D4	2.83 _a	
B4D1	3.00 _a	
B4D2	3.35 _a	
B4D3	2.88 _a	
B4D4	2.65 _{ab}	

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda (a,b) berarti berbeda nyata pada taraf uji BNJ 5%

4. Warna Kalus

Hasil pengamatan warna kalus eksplan embrio kedelai pada berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4 D. Menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh BAP secara tunggal berpengaruh tidak nyata terhadap warna kalus, sedangkan 2,4 D berpengaruh nyata taraf uji F 0,05. Sedangkan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D dan BAP berpengaruh nyata taraf uji F 0,01 Hasil uji BNJ (5 %) pada Tabel 5 menunjukkan bahwa skoring warna kalus tertinggi terjadi pada perlakuan kombinasi BAP 2 ppm dengan penambahan 2,4 D 8 ppm yaitu 6.75 dalam kategori antara warna hijau – hijau keputihan dan berbeda tidak nyata dengan perlakuan BAP 0 ppm dengan penambahan 2,4 D 8 ppm. Namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Menurut Fatmawati (2008) dalam Andaryani (2010), warna kalus

mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi dan kualitas kalus cukup baik. Warna kalus hijau keputihan ditunjukkan pada penambahan sitokinin menunjukkan warna hijau (cerah) dan kalus lebih tahan lama. Dalam penelitian ini, menunjukkan warna kalus semakin memudar (putih) setiap peningkatan konsentrasi 2,4 D.

Hasil analisis statistik pada parameter warna kalus ekplan embrio kedelai menunjukkan bahwa rata-rata skoring warna kalus tertinggi (6,75) pada perlakuan 1 ppm BAP dan 8 ppm 2,4 D. Perbedaan warna kalus menunjukkan tingkat perkembangan dari kalus. Menurut Fatmawati, (2008) dalam Andaryani (2010),

warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik.

Warna kalus yang bermacam-macam dipengaruhi oleh adanya pigmentasi cahaya

dan asal eksplan. Pigmentasi bisa merata keseluruhan permukaan kalus atau hanya sebagian saja. Warna putih kehijauan memungkinkan warna paling cerah dengan kandungan klorofil lebih sedikit. Warna hijau pada kalus akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil (Widyawati, 2010).

Tabel 5. Rata-rata Skoring Warna Kalus Embrio Kedelai pada Berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh BAP dan 2,4 D

Perlakuan	Rata-rata	NP BNJ 5%
B1D1	4.75 _{ab}	2.17
B1D2	3.50 _b	
B1D3	4.50 _b	
B1D4	3.75 _b	
B2D1	6.75 _a	
B2D2	4.50 _b	
B2D3	4.00 _b	
B2D4	4.25 _b	
B3D1	4.25 _b	
B3D2	4.50 _b	
B3D3	4.50 _b	
B3D4	4.00 _b	
B4D1	4.00 _b	
B4D2	5.00 _b	
B4D3	4.00 _b	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda (a,b) berarti berbeda nyata pada taraf uji BNJ 5%

KESIMPULAN

1. Zat pengatur tumbuh 2,4 D (auksin) secara tunggal berpengaruh tidak nyata terhadap waktu dan persentase pembentukan kalus, namun berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus dan warna kalus yang dihasilkan konsentrasi 2,4 D antara 8 ppm – 10 ppm memperlihatkan berat basah dan warna kalus yang lebih baik.
2. Zat pangatur tumbuh BAP (sitokinin) secara tunggal berpengaruh tidak nyata terhadap waktu dan persentase eksplan

berkalus embrio kedelai, namun pemberian konsentrasi BAP 1,0 ppm berpengaruh nyata dan dapat memperbaiki kualitas warna kalus, sedangkan BAP 2,0 ppm dapat meningkatkan berat kalus.

3. Kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D 10 ppm dan BAP 2 ppm menghasilkan berat basah kalus lebih baik yaitu 3,35 gram. Sedangkan kombinasi 2,4 D 8 ppm dan BAP 1 ppm menghasilkan warna kalus lebih baik yakni kategori antara hijau keputihan dan hijau.

DAFTAR PUSTAKA

- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi Bap Dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*) Secara In vitro. [Skripsi] Surakarta
- Armini, A.N. M., Wattimena dan Gunawan L.W., 1991. Perbanyak Tanaman Bioteknologi
- Balai Penelitian Tanah. Pemugaran lahan kering bereksi asam dan marginal. 2018.
- <http://balittanah.litbang.pertanian.go.id/index.php/berita/1397> pemugaran-lahan-kering-bereaksi-asam-dan-marginal. Diakses pada tanggal 30 September 2019.
- [BPS] Balai Pusat Statistika. 2017. Kajian Konsumsi Bahan Pokok 2017. Jakarta Pusat: BPS RI
- Chawla, H. S. 2003. Plant Biotechnology Laboratory Manual for Plant Biotechnology. Oxford & IBH Publishing. New Delhi.
- Evans, D.A., W.R. Sharp, and C.E. Flick. 1981. Growth and Behavior of Cell Cultures; Embryogenesis and Organogenesis. In
- T.A. Thorpe (Ed.) Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture. Academic Press New York. pp.45-113.
- Fiah RL, Taryono, Toekidjo. 2014. Kemampuan regenerasi kalus empat klon tebu (*Saccharum officinarum L.*). *Vegetalika*.3(1):91-101.
- Hayati K, Surya NY, Setiari N, 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*Medicago sativa L.*) secara in vitro dengan Penambahan Benzyl Amino Purin (BAP) dan α -Naphthalene Acetic Acid (NAA) Web publication
- Muchtadi, Deddy. 2009. Pengantar Ilmu Gizi. Bandung. Alfabeta.
- Rahayu, B., Solichatun dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Penentuan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica L.* *Biofrms* 1(1): 1-6.
- Syukur, M., Sujiprihati. S., Yunianti, R. 2012. Teknik Pemuliaan Tanaman Jakarta: Penebar Swadaya
- Widyawati, G. (2010). Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar. Tesis tidak diterbitkan. Surakarta: Universitas Sebelah Maret.
- Zulkarnain, H. 2009. Kultur Jaringan. Bumi Aksara. Jakarta