

PEMANTAPAN MASA INKUBASI KALUS KEDELAI SECARA *IN VITRO* DALAM MEDIA MS (Murashige dan Skoog) B5 (Gamborg)

Rahmad Hidayat, Abdullah², Aminah²

¹Mahasiswa Program Studi Agroteknologi, Faperta UMI, Makassar

²Dosen Program Studi Agroteknologi Universitas Muslim Indonesia

e-mail: rahmadht1995@gmail.com

ABSTRACT

Combination of Soybean Callus Incubation Period in vitro in MS (Murashige and Skoog) and B5 (Gamborg) Media (Supervised by Abdullah and Aminah). This study aimed to find a suitable medium for stabilizing the incubation period of soybean callus in vitro for the purposes of further selection. This research was conducted at the Laboratory of Bio-Science and Plant Reproduction Biotechnology, Agronomy Department, Agriculture Faculty, Hasanuddin University, Makassar, South Sulawesi. This research was done from June 2020 to October 2020. This research was conducted using a Completely Randomized Design (CRD) with two-factor treatment. The first factor was the type of medium (M1) with 2 levels of treatment. The second factor was the callus incubation period (W) with 5 levels of treatment. The data were analyzed using analysis of variance and 5% LSD. The parameters observed were callus wet weight, callus color and callus structure. The results showed that the MS subculture medium in stabilizing the incubation period of soybean callus tended to be better to callus color and callus structure. The highest wet weight of callus was in the M1W2 treatment with an average of 1.40 callus color scoring values, namely, 5.8 in the white color category and the callus structure with a scoring value of 4, namely callus which had a crumb texture (easily separated). Callus weight tends to be better on B5 medium. The incubation period for soybean callus tended to be better within 14 days, after subculturing on all types of medium (MS and B5) and subsequently decreased by increasing incubation time. The type of incubation medium did not interact with the callus incubation period.

Keywords : MS, B5, Callus, Soybean, Subculture.

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) adalah satu di antara tanaman pangan yang telah lama diusahakan di Indonesia. Kedelai mempunyai peranan cukup besar dalam memenuhi kebutuhan gizi masyarakat. Terutama sumber protein nabati (Sumarno dan Harnoto, 1983). Menurut Somatmadja (1985) Tanaman kedelai sebagai sumber protein utama dibandingkan dengan tanaman kacang-kacangan. Permintaan kedelai meningkat dengan pesat seiring dengan laju pertumbuhan penduduk. Namun laju permintaan kedelai tersebut, belum dapat diimbangi oleh peningkatan produksi, sehingga Indonesia masih harus mengimpor kedelai (Pitojo, 2003).

Berdasarkan data BPS (2018), pada periode Januari-Maret 2018 lahan pertanian kedelai meningkat dan mencapai 2 juta hektar dengan asumsi kondisi eksisting sekitar 1,5 juta hektar dan tujuan pengembangan lahan baru 500 ribu hektar. Ketersediaan luas lahan

ini diharapkan dapat memenuhi kebutuhan didalam negeri. Namun demikian, varietas kedelai yang dikembangkan produktivitasnya relatif masih rendah dan daerah adaptifnya terbatas pada lahan subur (sawah dan tegalan). Kendala utama peningkatan produksi kedelai ini antara lain tidak tersedianya varietas yang adaptif pada wilayah marginal dengan produktivitas yang tinggi. Penelitian varietas baru secara konvensional terus dikembangkan dengan ditemukannya beberapa varietas baru kedelai. Namun demikian, pengembangan varietas baru secara bioteknologi, dalam ini secara kultur jaringan, juga terus dikembangkan dan dipadukan dengan metode konvensional (Adisarwanto dan Wudianto 2002).

Perbanyakan tanaman dengan teknik *in vitro* atau kultur jaringan merupakan teknik budidaya sel, jaringan dan organ tanaman dalam suatu lingkungan yang terkendali dan dalam keadaan aseptik atau bebas

mikroorganisme (Santoso dan Nursandi, 2003). Penggunaan teknik ini merupakan cara yang tepat untuk mendapatkan varietas baru, karena akan dimungkinkan untuk memperoleh keragaman somaklonal dari tanaman (Dolozel dan Novak, 1986). Keragaman somaklonal adalah keragaman genetik yang didapat dari tanaman yang berasal dari kultur sel somatik (sel daun, sel akar, kalus dan lain-lain) (Wattimena dan Mattjik, 1991). Keragaman somaklonal dapat diperoleh melalui pengembangan kalus dan eksplan.

Kultur kalus bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Kalus diharapkan memperbanyak dirinya (massa selnya) secara terus-menerus. Sel-sel penyusun kalus adalah sel-sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan sel-sel lain dan mudah mengalami pembelahan genetik karena sel-selnya terbuka. Perkembangan kalus dalam kultur sangat dipengaruhi oleh formulasi media dan suplemen hormon tumbuh yang digunakan, serta sumber eksplan. Namun, bila eksplan yang digunakan mengandung kambium, maka kalus dapat terbentuk tanpa perlakuan zat pengatur tumbuh. Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman, tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula (Gunawan, 1988).

Masa Inkubasi kalus merupakan waktu yang diperlukan oleh kalus untuk dapat tumbuh dan selanjutnya dapat di subkultur dengan cara mengambil sebagian kalus dan memindahkannya pada medium baru. Dengan sistem induksi yang tepat, kalus dapat berkembang menjadi tanaman yang utuh (planlet). Perkembangan kalus harus terus terjaga agar masa kalus yang digunakan untuk inkubasi keragaman somaklonal dapat terpenuhi. Pemantapan masa inkubasi kalus penting artinya dalam menjaga tingkat pertumbuhan kalus. Namun demikian, masa

inkubasi kalus dipengaruhi oleh jenis media inkubasi yang digunakan. (Purnomo, 1996).

Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk menentukan jenis media kultur yang dapat memberikan masa inkubasi yang lebih lama dengan tingkat kualitas kalus yang baik.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mencari media yang sesuai untuk pemantapan masa inkubasi kalus kedelai secara *In vitro* untuk keperluan pemberian tekanan seleksi lebih lanjut

Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi metode dasar subkultur yang sesuai untuk pemantapan masa inkubasi kalus tanaman kedelai untuk keperluan pengembangan varietas baru kedelai.

Hipotesis

1. Terdapat satu jenis media sub kultur yang memberikan pengaruh lebih baik terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus kedelai
2. Masa inkubasi kalus kedelai selama 28 hari dapat memberikan perkembangan kalus secara optimal
3. Terdapat interaksi antara jenis media (MS dan B5) subkultur dan masa inkubasi kalus kedelai

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bio-Sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan. Penelitian ini akan berlangsung pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2020.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan, yaitu : media dasar formulasi Murashige dan skoog (MS) (Lampiran 1) dan Media B5 (Lampiran2) kalus kedelai, gula pasir, agar powder, aquades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, gula pasir

(sucrose), NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, dithane, betadine, detergen, spritus, NaClO, zat pengatur tumbuh Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dan Benzil Amino Purin (BAP).

Alat yang digunakan yaitu : gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, pisau scalpel, Bunsen, pinset, gunting, *laminar cabinet air flow*, timbangan analitik, corong, sudip, microwave, magnetik stirrer, dispenser, mikropipet, pipet volumetrik, autoklaf, lampu spiritus, penyemprot alkohol (*hand sprayer*), pH meter, lemari pendingin, oven, rak kultur, alat pemotret, thermometer, lampu fluorescence, lux meter, kertas label, kertas payung, kertas

lakmus, *hot plate*, kertas tissue, korek, aluminium foil dan kertas bekerglass.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan dua faktor. Faktor pertama adalah jenis media (M1) dengan 2 taraf perlakuan yaitu : media MS (M1) dan media B5 (M2). Faktor kedua masa inkubasi kalus (W) dengan 5 taraf perlakuan, yakni : 14 hari (W1), 28 hari (W2), 42 hari (W3), 56 hari (W4) dan 70 hari (W5). Dari kedua faktor perlakuan tersebut diperoleh 10 kombinasi perlakuan (Tabel 1) dan setiap kombinasi perlakuan diulang 10 kali, sehingga terdapat 100 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari satu botol kultur kalus.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan jenis media (M) dan masa inkubasi (W) kalus kedelai dalam media sub kultur.

Jenis Media	Waktu Inkubasi (Minggu)				
	W1	W2	W3	W4	W5
MS (M1)	M1	M1	M1	M1	M1 W5
	W1	W2	W3	W4	
B5 (M2)	M2	M2	M2	M2	M2 W5
	W1	W2	W3	W4	

Pelaksanaan Penelitian

1. Sterilisasi Alat-alat

Alat-alat gelas (*glass ware dissecting*) (scalpel, mata scalpel, pinset, gunting), dicuci dengan detergen kemudian dibilas dengan air mengalir dan selanjutnya ditiriskan. Alat yang telah dicuci bersih disterilisasi dalam mesin autoclaf pada tempratur 121°C dan 17,5 psi selama 60 menit. Alat dari bahan logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas HVS. Pada scalpel, gagangnya disterilkan dengan pemanasan dan pisaunya (*blade*) dicelupkan kedalam alcohol 96%.

2. Pembuatan media

Media yang digunakan dalam penelitian adalah media dasar Murashige dan Skoog (MS) dan Gamborg (B5) sebanyak masing-masing 1 liter. Pembuatan media, dilakukan dengan cara memipet 4 ml larutan stok yang telah dibuat

sebelumnya (Tabel Lampiran 1) dan (Tabel Lampiran 2) lalu dicampurkan kedalam labu takar 1 liter dan diaduk hingga tercampur merata. Larutan yang telah dibuat kemudian ditambahkan gula pasir 30 g/l untuk MS dan 20 g/l untuk B5.

Media dasar MS dan B5 yang telah jadi ditambahkan suplemen hormon tumbuh 2,4 D dan BAP sesuai dengan perlakuan. Larutan media yang telah ditambahkan hormon tumbuh diaduk hingga tercampur merata, kemudian dilakukan pengukuran pH larutan sampai 5,8 dengan menggunakan pH meter dan kertas lakmus. Apabila pH media terlalu asam (Ph rendah) maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N jika pH media terlalu basa (Ph tinggi) maka ditambahkan HCL 0,1 N hingga pH sesuai dengan yang diinginkan. Setelah pengukuran pH media ditambahkan bahan pematat berupa agar-agar untuk MS sebanyak 8 g/l sedangkan B5 7 g/l. Larutan

dihomogenkan kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih.

Media yang telah mendidih atau masak dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 20 ml/botol kemudian ditutup hingga rapat. Media yang telah dimasukkan kedalam botol kultur selanjutnya dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan mesin autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi selama 15 menit

3. Inkubasi Media

Media Murashige dan Skoog (MS) dan Gamborg (B5) yang telah dibuat dan sebelum digunakan diinkubasikan terlebih dahulu kedalam ruang kultur selama 7 hari pada suhu kamar (25°C) untuk memastikan tidak terjadinya kontaminasi pada media. Media yang telah diinkubasi dan tidak terkontaminasi kemudian digunakan untuk subkultur.

4. Sterilisasi Ruang Tanam

Laminar Air Flow cabinet (LAFC) yang digunakan disterilisasi dengan sinar UV selama 15 menit dan selanjutnya disemprot dengan alkohol 70%. Alat-alat dan botol kultur yang digunakan dimasukkan kedalam laminar dan terlebih dahulu disemprotkan dengan alkohol 70%.

5. Subkultur

Bahan kalus yang digunakan adalah kalus yang telah berumur 4 minggu dan disubkultur ke dalam media perlakuan. Kalus yang disubkultur adalah kalus yang berwarna putih kekuningan dan penanaman dilakukan dalam laminar. Kalus dipindahkan dengan cara menggunakan pinset steril dan sebelum ditanam kalus

dicelupkan terlebih dahulu kedalam aquades yang ditambahkan larutan betadine agar kalus terhindar dari kontaminasi. Botol kultur yang telah ditanami ditutup rapat dan dilapisi dengan plastic wrap (udara tidak masuk) dan diletakkan di rak pada ruang inkubasi kultur.

6. Pemeliharaan dan Pengamatan

Kalus yang telah disubkultur dalam media perlakuan disimpan dalam ruang kultur dengan suhu 20°C, kelembapan 90% dan pencahayaan dalam ruang kultur diatur dengan intensitas 1000-1500 Lux. Pengamatan pertumbuhan dan perkembangan kalus diamati setiap perlakuan selama 10 pekan.

Parameter Pengamatan

1. Bobot basah kalus

Pengamatan berat basah kalus dilakukan di awal dan di akhir penelitian. Pada awal penelitian dilakukan penimbangan terhadap kalus (botol kultur + kalus) dan pada pengamatan terakhir dilakukan penimbangan kembali (botol kultur + kalus tumbuh). Berat basah dapat dihitung dengan cara sebagai berikut :

Bobot kalus (g) = bobot akhir kalus (botol kultur + kalus tumbuh) - bobot awal kalus (botol kultur + kalus)

2. Warna kalus

Warna kalus dapat diamati pada awal dan akhir pengamatan dengan pemberian skor atau bobot berdasarkan warna yang ada pada kalus. Menurut Abdul Kadir (2006) Pengamatan warna kalus dapat di bedakan sebagai berikut:

Tabel 2. Nilai skoring warna kalus kedelai

No	Warna Kalus	Skor	Keterangan
a.	h (hijau)	7	Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau. Kalus yang didalam sel-selnya masih aktif membelah dan terkandung klorofil.
b.	h/k(hijau keputihan)	6	Warna kalus hijau keputihan dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik
c.	P (putih)	5	Warna kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang belum mengandung klorofil , tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi.
d.	p/k (putih kekuningan)	4	Kalus berwarna putih kekuningan mengalami degradasi fisiologis atau penurunan tingkat fisiologi tanaman akibat kekurangan unsur hara atau hormone tumbuhnya
e.	k/c (kuningkecoklatan)	3	Warna kuning kecoklatan pada kalus akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat sterilisasi eksplan.
f.	c/h (coklat kehitaman)	2	Warna kalus semakin gelap, berarti pertumbuhan kalus tersebut semakin menurun
g.	h (hitam)	1	Warna kalus yang hitam disebabkan karena adanya metabolisme senyawa fenol yang bersifat toksit, adanya perubahan warna kalus seperti ini mengalami oksidasi dan tidak dapat digunakan.

3. Struktur kalus

Pengamatan struktur kalus dilakukan di akhir penelitian yaitu secara visual, dengan mengamati karakteristik kalus. Menurut

Gultom, dkk (2012) pengamatan struktur kalus dapat dibedakan sebagai berikut :

Tabel 3. Nilai skoring struktur kalus kedelai

No	Struktur kalus	Skor	Keterangan
a.	Tidak terbentuk kalus	0	Belum terdiferensiasi
b.	Terbentuk kalus friable type 1	1	Kalus yang teksturnya seperti kapas
c.	Kalus Kompak	2	Permukaan kalus mengkilap dan seluruh permukaan rata
d.	Kalus kompak bernodul	3	Muncul pada bagian eksplan yang dilukai
e.	Terbentuk kalus friable type 2	4	Kalus yang teksturnya mudah pecah (remah)
f.	Terbentuk kalus friable type 2 bernodul	5	Kalus yang diikuti dengan pembentukan nodul

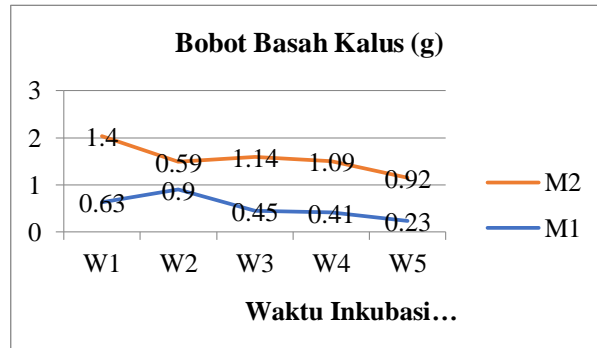
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

1. Bobot Basah Kalus (g)

Hasil pengamatan bobot basah kalus kedelai yang disubkultur pada 2 jenis media (MS dan B5) terhadap masa inkubasi dan

sidik ragamnya disajikan pada Table Lampiran 3a dan 3b. Sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan jenis media (MS dan B5) dan masa inkubasi serta kombinasi diantara keduanya berpengaruh tidak nyata pada uji taraf F 0.01 terhadap bobot basah kalus kedelai.

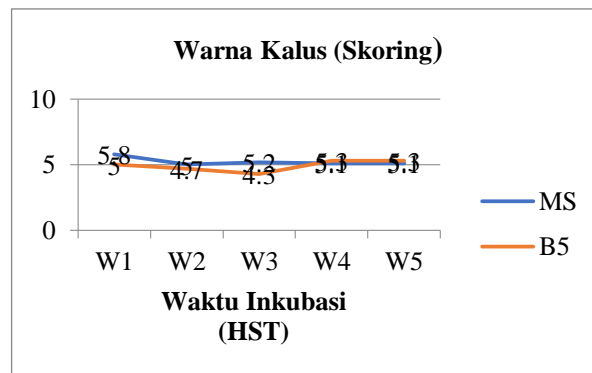


Gambar 1. Rata-rata bobot basah kalus kedelai dalam media subkultur dari berbagai kombinasi media MS dan B5

Pada Gambar 1, menunjukkan bahwa rata-rata bobot basa kalus kedelai ada kecenderungan menurun seiring dengan lama waktu inkubasi. Namun demikian, rata-rata bobot basah kalus cenderung lebih tinggi pada media B5 dibandingkan dengan media MS. Bobot kalus dalam media B5 lebih tinggi (1,40 g) pada 14 hari setelah masa inkubasi (M2W1) semakin lama masa inkubasi kalus bobot kalus juga semakin menurun.

Hasil pengamatan warna kalus kedelai yang disubkultur pada 2 jenis media (MS dan B5) terhadap masa inkubasi dan sidik ragamnya disajikan pada Tabel Lampiran 4a dan 4b. Sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan 2 jenis media (MS dan B5) dan masa inkubasi serta kombinasi diantara keduanya berpengaruh tidak nyata pada uji taraf F 0,01 terhadap warna kalus kedelai

2. Warna Kalus



Gambar 2. Rata-rata Skoring warna kalus kedelai dalam media subkultur dari berbagai kombinasi media MS dan B5

Pada Gambar 2, menunjukkan bahwa rata-rata nilai skoring warna kalus cenderung tertinggi pada perlakuan media MS (Murashige and Skoog) dibandingkan media B5. Pada masa inkubasi 14 hari setelah subkultur terlihat warna kalus dalam kategori warna putih kehijauan (kalus embrionik (Nilai skoring 5,8) dan selanjutnya nilai skoring menurun seiring dengan masa inkubasi. Nilai skoring warna kalus hingga masa inkubasi

kalus 70 hari pada media B5 (M2W2), yakni 4,3 dengan tipe kalus putih kekuningan. Kalus seperti ini telah mengalami degradasi fisiologis akibat telah berkurangnya tingkat serapan nutrisi dan hormon tumbuh.

3. Struktur Kalus

Hasil pengamatan struktur kalus kedelai yang disubkultur pada 2 jenis media (MS dan B5) terhadap masa inkubasi dan sidik ragamnya disajikan pada Tabel Lampiran 5a

dan 5b. Sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan 2 jenis (media MS (Murashige and Skoog) dan B5 (Gamborg)) berpengaruh sangat nyata sedangkan waktu inkubasi

maupun interaksinya dengan jenis media berpengaruh tidak nyata pada uji taraf F 0,01 terhadap struktur kalus kedelai.

Tabel 2. Rata-rata nilai skoring struktur kalus kedelai dalam media subkultur dari berbagai kombinasi MS dan B5

Media	Waktu					Rata-rata	BNT 5%
	W1	W2	W3	W4	W5		
M1	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,00 ^b	
M2	3,6	4,0	3,6	3,6	3,6	3,68 ^a	0,17
Rata-rata	3,8	4	3,8	3,8	3,8		

Keterangan : angka yang diikuti huruf (a,b) yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji BNT 0,05

Berdasarkan Tabel 4, menunjukkan bahwa rata-rata nilai skoring struktur kalus kedelai tertinggi terjadi media MS (M1) dengan nilai skoring rata-rata 4,0. Nilai skoring tersebut menunjukkan bahwa struktur kalus bersifat friabel tipe 2 yakni kalus yang memiliki tekstur remah (mudah terpisah) dan berbeda nyata dengan media B5 (Gamborg) yang memiliki nilai skoring rata-rata 3,6 dalam kategori kalus kompak bernodul.

Pembahasan

1. Pengaruh Jenis Media (MS dan B5) dalam Masa Inkubasi Kalus Kedelai

Hasil penelitian terhadap masa inkubasi kalus kedelai pada 2 jenis media (MS dan B5) berpengaruh tidak nyata terhadap bobot basah kalus (Tabel Lampiran 3a dan 3b) dan warna kalus (Tabel Lampiran 4a dan 4b), sedangkan terhadap struktur kalus berpengaruh sangat nyata (5a dan 5b). Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa ada kecenderungan bobot basah kalus tertinggi terjadi pada media B5 dengan hingga masa inkubasi 14 hari setelah subkultur (M2W1) dan selanjutnya semakin lama masa inkubasi bobot basah kalus cenderung menurun.

Media B5 (gamborg) memiliki hara organik yang lebih rendah sehingga cocok pada pertumbuhan kedelai, umumnya media B5 yang kadar unsur hara organiknya lebih rendah daripada MS merupakan suatu kondisi yang lebih baik bagi sel spesies tanaman tertentu (Wetter dan Constabel, 1991). Seperti

yang dikemukakan Purnamaningsih *et al.*(2005) dalam Hati (2007) bahwa pada beberapa jenis tanaman, pemakaian media dengan kandungan garam mineral yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan kultur. Pemakaian media dengan komposisi garam mineral yang mempunyai konsentrasi tinggi kurang efektif, karena adanya garam mineral yang tidak dimanfaatkan oleh tanaman.

Media yang mengandung unsur hara makro dan mikro berpengaruh baik terhadap warna dan struktur kalus kedelai. Gunawan (1990), menyatakan bahwa dari sekian banyak jenis media dasar yang digunakan dalam kultur jaringan, media Murashige dan Skoog adalah media yang mengandung unsur hara organik yang baik untuk pertumbuhan tanaman dalam kultur jaringan. Media Murashige dan Skoog mengandung hara dan mikro, media MS mengandung hara dan mikro seperti NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Murashige dan Skoog, 1962). Hal ini diperkuat oleh Pandinagan (2006) menyatakan *C. roseus* yang ditanaman pada medium MS dengan penambahan 2,4-D akan membentuk kalus yang berwarna putih dan meremah dan pertumbuhannya relatif cepat.

Pada media MS cenderung bobot basah kalus tertinggi pada masa inkubasi 28 hari setelah tanam (M1W2) dan selanjutnya

mengalami penurunan seiring dengan lama masa inkubasi. *Rahayu et al.*, (2003), menyatakan bahwa berat basah kalus yang besar disebabkan karena kandungan airnya tinggi, selain itu berat basah yang dihasilkan juga tergantung pada morfologi kalus, kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Hasil Penelitian terhadap warna kalus kedelai pada media MS (1 ppm BAP + 10 ppm 2,4-D) tidak berpengaruh nyata (Tabel 4.) Warna kalus dengan nilai Skoring tertinggi terdapat pada perlakuan M1W1 dengan rata-rata 5,8 dalam kategori antara warna putih sementara warna kalus yang terendah terdapat pada perlakuan M1W5 dengan rata-rata 4,0 dengan kategori warna putih kekuningan, ini menunjukkan bahwa pertumbuhan dan perkembangan kalus masih baik.

Hasil pada perubahan warna kalus secara keseluruhan menunjukkan bahwa warna kalus cenderung berwarna putih kekuning-kuningan dan pada sebagian perlakuan juga ditemukan warna hijau pada kalus yang terbentuk. Warna kalus yang terbentuk menunjukkan bahwa terjadinya aktivitas pembelahan pada kalus. Hal ini sesuai dengan pendapat Shofiyah dan Purnawanto (2010) yang menyatakan bahwa warna kalus dapat bermacam-macam tergantung dari jenis sumber eksplan itu diambil, seperti warna kekuning-kuningan, putih, hijau, kuning kejingga-jinggaan. Hasil yang sama dari penelitian Rusdianto dan Indrianto (2012) yang menyatakan bahwa kalus yang berwarna putih bening atau kekuningan merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik.

Hasil penelitian struktur kalus kedelai pada media MS (1 ppm BAP + 10 ppm 2,4-D) berpengaruh sangat nyata (Tabel 5). Pada struktur kalus mulai dari perlakuan M1W1, M1W2, M1W3, M1W4 dan M1W5 memiliki nilai skoring yang sama dengan nilai rata-rata 4 dalam kategori kalus yang teksturnya mudah pecah (remah). Kalus remah merupakan kalus

yang tersusun atas sel-sel yang panjang bebrbentuk tubular yang mana struktur sel-selnya renggang tidak teratur dan mudah rapuh (Manuhara, 2001). Kalus yang kompak mempunyai struktur sel yang rapat, padat dan sulit untuk dipisah-pisahkan dan mempunyai vakuola yang lebih besar dalam sel-selnya serta mempunyai dinding polisakarida yang lebih besar (Herwinaldo, 2010). Terbentuknya kalus berstruktur remah dipicu adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang timbul dalam membentuk kalus (Widyawati, 2010).

Kualitas dari suatu kalus juga dapat dilihat dari struktur kalus, pada penelitian ini kalus yang terbentuk dominan berstruktur remah dan dapat dikatakan kalus berkualitas baik. Hal ini sejalan dengan yang diungkapkan Thomy (2012) mengatakan bahwa struktur kalus yang remah atau mudah pecah dianggap baik. Hal ini dikarenakan kalus yang remah mudah untuk melakukan pemisahan menjadi sel-sel tunggal, disamping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Adanya struktur tersebut dapat mengupayakan untuk perbanyak dalam hal jumlah kalus yaitu melalui suspensi yang lebih mudah. Kalus terbentuk karena adanya keseimbangan antara pemberian auksin dan sitokini

2. Masa Inkubasi

Hasil penelitian terhadap masa inkubasi kalus kedelai pada media B5 menunjukkan bahwa semakin lama masa inkubasi bobot kalus, warna dan struktur kalus cenderung semakin menurun pada semua jenis media subkultur yang dilakukan (MS & B5). Masa kultur yang panjang dalam media yang tetap akan menyebabkan terjadinya kehabisan unsur hara dan air. Kurangnya suplai air dalam proses pertumbuhan kalus menyebabkan kalus tidak dapat melakukan pembelahan sel secara sempurna sehingga massa sel kalus tidak bertambah dan mengalami penurunan.

Menurut Gardner (1991), air memiliki bermacam-macam fungsi bagi tanaman, yaitu 1) sebagai pelarut unsur hara dalam tanah, 2)

medium untuk reaksi kimia, 3) sebagai medium transport, 4) sebagai penyusun sitoplasma sekaligus sebagai medium yang memberikan tekanan turgor pada sel tanaman, tekanan turgor dapat memacu pembesaran sel, 5) sebagai bahan baku untuk fotosintesis, proses hidrolisis dan reaksi kimia lainnya dalam tumbuhan dan 6) berperan dalam proses transpirasi sehingga sangat dibutuhkan dalam setiap proses pertumbuhan.

Masa inkubasi yang lebih baik adalah 14 hari setelah subkultur terdapat semua parameter pengamatan (bobot kalus, warna kalus dan struktur kalus) hal ini disebabkan karena pada media (MS dan B5) masih tersedia sumber hara makro dan mikro yang dibutuhkan oleh pertumbuhan dan perkembangan kalus kedelai selain itu pada medium yang ditambahkan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin masih mengandung air bagi kalus. Kandungan air dalam kalus diduga dipengaruhi oleh adanya auksin dalam media. George dan Sherrington (1984) menyebutkan bahwa auksin ini menyebabkan diambilnya ion H^+

Bobot basah kalus tertinggi yaitu, terjadi pada perlakuan M2W1 dengan rata-rata berat kalus 1,40 g sedangkan bobot yang terendah terdapat pada perlakuan M2W5 dengan rata-rata berat kalus 0,23 g. Secara analisis data yang telah diuji dengan menggunakan sidik ragam bobot basah kalus tidak terdapat perbedaan yang signifikan namun dengan pemberian media B5 dengan konsentrasi (2 ppm BAP + 10 ppm 2,4-D) pada kalus kedelai sebagai media mampu untuk memberikan masa inkubasi untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus kedelai dalam kurun waktu yang cukup lama yakni 70 hari.

Hasil Penelitian terhadap warna kalus kedelai pada media B5 (2 ppm BAP + 10 ppm 2,4-D) berpengaruh tidak nyata (Tabel 4.) Warna kalus dengan nilai Skoring tertinggi terdapat pada perlakuan M2W4 dan M2W5 dengan rata-rata 5,3 dalam kategori antara warna putih sementara warna kalus yang

terendah terdapat pada perlakuan M2W3 dengan rata-rata 4,3 dengan kategori warna putih kekuningan, ini menunjukkan bahwa pertumbuhan dan perkembangan kalus masih baik. Warna kalus mengalami perubahan seiring dengan pertumbuhan umur kalus. Menurut Ariati (2012), kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki butir pati yang tinggi. Pembentukan warna kalus juga dipengaruhi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media inisiasi.

Hasil penelitian struktur kalus kedelai pada media B5 (2 ppm BAP + 10 ppm 2,4-D) berpengaruh sangat nyata. Struktur kalus dengan nilai skoring tertinggi pada perlakuan M2W1, M2W3, M2W4, M2W5 dengan rata-rata 4 dalam kategori kalus yang teksturnya mudah pecah (remah). Thomy (2012) mengatakan bahwa struktur kalus yang remah atau mudah pecah dianggap baik.

KESIMPULAN

Kesimpulan

1. Media subkultur MS dalam pemantapan masa inkubasi kalus kedelai cenderung lebih baik terhadap warna kalus dan struktur kalus. Bobot basah kalus tertinggi pada perlakuan M1W2 dengan rata-rata 1,40 nilai skoring warna kalus yaitu, 5,8 berada pada kategori warna putih dan struktur kalus dengan nilai skoring yaitu 4, yakni kalus yang memiliki tekstur remah (mudah terpisah). Bobot kalus cenderung lebih baik pada media B5.
2. Masa inkubasi kalus kedelai cenderung lebih baik dalam waktu 14 hari, setelah subkultur pada semua jenis media (MS dan B5) dan selanjutnya mengalami penurunan seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi.
3. Jenis media inkubasi tidak berinteraksi dengan masa inkubasi kalus

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Kadir. 2006. Induksi dan Perbanyakkan Populasi Kalus, Regenerasi Tanaman Serta Uji Respon Kalus Terhadap Konsentrasi PEG dan Dosis Iradiasi Sinar Gamma. Makassar, Fakultas Pertanian Universitas Islam Makassar
- Adisarwanto, T. 2005 . Budidaya dengan Pemupukan yang Efektif dan Pengoptimalan Peran Rintil Akur Kedelai. Penebar Swadaya. Jakarta
- Ariati, S.N. 2012. Induksi Tanaman Kakao pada Medium MS dengan Penambahan 2,4-D. *Jurnal Natural Science*. Vol.1(1): 74-84
- Bonga, J.M. and P. Von Anderkas. 1992. In vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Dixon, R.A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures in Dixon R.A. (ed.), 1985. Plant cell culture a practical approach. IRL Press, Oxford: 1-20.
- Dolozel, Y dan F.M Novak. 1986. Sister Chromatic Exchanges in Garlic (*Aliiurn sativum* L.) Callus Cells. *Plant Cell*.
- Fitriani, A. 2003. Kandungan ajmalisin pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don setelah Dielistasi homogen jamur phythium aphanidermatum edson fitzp. Diakses pada tanggal 1 November 2009. http://tumoutou.net/6_sem2_023/any_fitriani.htm.
- George, E.F dan P.D Sherrington. 1984. Planr Propagation by Tissue Culture. Eastern Press Reading Berk. England.
- Gultom, M.S., Anna, N., dan Siregar, E.B.M 2012. Respon Eksplan Biji Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lank.) terhadap Pemberian IAA secara In Vitro. *Peronema Forestry Science Journal*, (1): 1-6.
- Gunawan, L. W. 1989. Teknik Kultur Jaringan tumbulzan. Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Hendaryono, dan A. Wijayani. 1998. Teknik Kultur Jaringan. Jakarta: Yasaguna.
- Hendaryono, D. P. S dan A. Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif Modern. Yogyakarta: Kanisius
- .Herwinaldo, D. C. 2010. Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa terhadap Pertumbuhan dan Induksi Embriogenesis Somatik Kultur Kalus Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). (Skripsi). Fakultas MIPA. Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Manuhura, Y. S. W. 2001. Regenerasi tanaman sawi (*Brassica juncea* L. Var Morakot) melalui teknik kultur jaringan, *Jurnal MIPA Universitas Airlangga* 6(2):127-130)
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*. 15:473-407.
- Pandiangan D. 2006. Respon Pertumbuhan Kalus *Catharanthus roseus* yang diberi Perlakuan Triptofan. *Biotika* 5(2): 48-56.
- Pierik, R.L.M., 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhaf Publisher. Dorroocht, The Netherland
- Pitojo, Setijo. 2003. Benih Kedelai. Yogyakarta: Kanisius
- Preece, J.E. and Sutter E.G., 1993. Aclimation of micropropagated to the green house and field in Micropropagation technology and application. Deberg, P.C. and R.H. Zimmerman (eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Susila, S.D. dan Susanto. 2003. Kedelai, Deskripsi, Budidaya dan Sertifikasi Benih. Surabaya: Expert JICA-SSP

- Thorpe, T.A., 1981. Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture. Academic Press, New York.
- Rubatzky, Viencent. E dan Yamaguchi, Mas. 1998. Sayuran Dunia 2, Prinsip, Produksi, Dan Gizi. Bandung: Penerbit ITB.
- Rusdianto dan A. Indrianto. 2012. Induksi kalus embriogenik pada wortel (*Daucus carota* L.) menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. *Jurnal Bionature*. 13(2):136-140.
- Santoso, U & F. Nursandi. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. Malang: Pusbitan UMM
- Scowcroff, W.R., P.J Larkin dan R.I.S Brettell. 1983. Genetic Variation from Tissue Culture and Protoplast in Plant Pathology (Edited by Helgeson J.P and B.J Deverall). Academic Press. London.
- Sitorus M, ED Hastuti, N Setiari. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara In vitro pada Media Murashige & Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Bioma* 13(1): 1-7.
- Somatmadja, S. 1985. Kedelai. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Kedelai. P 122-123
- Sumardi, Issrep. 1992. Struktur dan Perkembangan Tumbuhan. Yogyakarta: UGM
- Thomy, Z. 2012. Effect of plant growth regulator 2,4-D and BAP on callus growth of plants producing gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). Prsiding Seminar Hasil Nasional Biologi. Medan, 11 Mei 2012
- Yusnita. 2004. Kultur jaringan, Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Wareing, P.F., and D.J. Philips. 1987. The Control of Growth and Differentiation in Plants Second Edition. Pergamon Press, Oxford, 347 p
- Wetter, L.R. dan Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan*. ITB Press. Bandung.
- Widiastoety, D, Syafril, dan Haryanto. 1991. Kultur In Vitro Anggrek *Dendrobium* Dalam Media Cair. *Jurnal hortikultura* 1(3): 6-10
- Widyawati, Geningsih. 2010. Pengaruh Variasi NAA dan BAP terhadap induksi kalus jarak pagar. (*Tesis*) Universitas Sebelas Maret. Surakarta.