

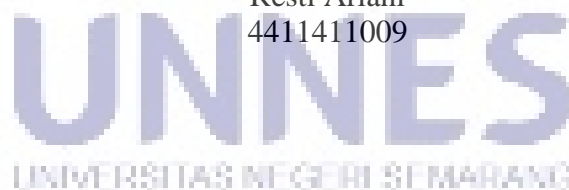


**RESPON PEMBENTUKAN
KALUS KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.)
PADA BERBAGAI KONSENTRASI 2,4-D DAN BAP**

Skripsi
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

Oleh:

Resti Ariani
4411411009



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2016

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul: "**Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP**" dan seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri, bebas plagiat, dan apabila dikemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Semarang, 17 Maret 2016



Resti Ariani

4411411009

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

**Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna Pruriens L.*) pada
Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP**

Disusun oleh

Resti Ariani

4411411009

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada
tanggal 8 April 2016.



Prof. Dr. Zaenuri, S.E., M.Si., Akt.
NIP 196412231988031001

Sekretaris

Dra. Endah Perhati, M.Si.
NIP 196511161991032001

Ketua Penguji

Drs. Krispinus Kedati Pukan, M.Si.
NIP 195507311985031002

Anggota Penguji/
Pembimbing I

Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si.
NIP 196404271990031003

Anggota Penguji/
Pembimbing II

Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si.
NIP 196009161986012001

MOTTO

Do the best and pray. God will take care of the rest – Every action has an equal and opposite reaction

Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum kecuali kaum itu sendiri yang mengubah nasibnya (QS. Ar-Ra'd: 11)



PERSEMBAHAN

UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

Untuk kedua orang tua saya tercinta,
H. Zainurrohim dan Hj. Siti Nafi'ah yang tidak pernah lelah untuk selalu mendoakanku
Untuk adik-adik saya, Fiqi dan Aldi
Untuk teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2011.
Untuk sahabat-sahabat terbaikku yang selalu memberikan motivasi dan inspirasi
Anda yang membaca skripsi saya

PRAKATA

Puji syukur senantiasa terucap kehadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya tersusunlah skripsi berjudul “Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP”.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak sehingga penyusunan skripsi ini dapat berjalan dengan lancar. Untuk itu ucapan terima kasih disampaikan kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di UNNES.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberi izin penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.
3. Ketua Jurusan Biologi yang membantu kelancaran administrasi penulis dalam penyelesaian skripsi.
4. Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si. selaku dosen pembimbing sekaligus penguji II yang selalu memberikan masukan dan pengarahan selama pembimbingan skripsi.
5. Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si. selaku dosen pembimbing sekaligus penguji III yang selalu memberikan masukan dan pengarahan selama pembimbingan skripsi.
6. Drs. Krispinus Kedati Pukan, M.Si. selaku dosen penguji I yang telah memberikan kritik dan saran dalam menguji kelayakan naskah skripsi saya.
7. Bapak Ibu dosen dan seluruh staf pengajar Jurusan Biologi, untuk ilmu yang diberikan pada penulis.
8. Kepala Laboratorium dan Staf Laboratorium Biologi FMIPA UNNES atas semua pelayanan dan fasilitas dalam menyelesaikan penelitian.
9. H. Zainurrohim dan Hj. Siti Nafi'ah, kedua orang tua saya selaku penyemangat sejati atas kesabaran dan do'a yang selalu terucap untuk putra putrinya. Adikku Fiqi dan Aldi yang selalu memberikan motivasi.
10. Teman-teman dan asisten mahasiswa '*Plant Tissue Culture*' Queen, Miqon, Adi, Nobita, Amel, Tiara, Nunik dan Mbak Umi.

11. Teman-teman Biologi 2011 khususnya *Biotechnology* dan *Botany*, Kos Wanodyatama, Berbagi Ceria *Share & Repeat*, dan Sedekah Rombongan terimakasih untuk semangat, kebersamaan dalam suka maupun duka.
12. Semua pihak yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga hasil penelitian skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk kesempurnaan skripsi ini.

Semarang, 17 Maret 2016

Penulis



UNNES
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

ABSTRAK

Ariani, R. 2016. Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Dr. Yustinus Ulung Anggraito, M.Si. & Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si.

Di Indonesia, konsumsi koro benguk lebih rendah dibandingkan dengan kacang-kacangan lainnya seperti kacang tanah dan kedelai. Rendahnya tingkat konsumsi tersebut disebabkan adanya kandungan anti-nutrisi yang dapat menyebabkan keracunan. Perakitan varietas baru dalam rangka memperbaiki mutu tanaman perlu dilakukan. Kegiatan tersebut memerlukan kalus yang diperoleh dari proses induksi kalus untuk mengoptimalkan serangkaian tahapan menuju transformasi gen. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi 2,4-diclorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan benzylaminopurin (BAP) optimal dan pengaruhnya terhadap pembentukan kalus dari eksplan setengah biji koro benguk. Rancangan penelitian yang digunakan ialah Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan dua faktor: yaitu konsentrasi 2,4-D (0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l) dan konsentrasi BAP (1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l) untuk induksi kalus. Kalus hasil induksi dipindahkan ke media MS 0, dilanjutkan pada media MS (*Murashige Skoog*) yang ditambah BAP, IBA (*Indole-3-Butyric Acid*), GA (*Gibberelic Acid*). Parameter yang diamati ialah: waktu terbentuk kalus, persentase eksplan berkalus, berat kalus per eksplan, warna dan tekstur kalus. Konsentrasi BAP, 2,4-D dan interaksi keduanya tidak berpengaruh terhadap waktu terbentuknya kalus dan persentase eksplan berkalus, namun konsentrasi BAP berpengaruh terhadap berat kalus. Konsentrasi BAP 3 mg/l mengakibatkan pertumbuhan kalus yang lebih berat dibandingkan konsentrasi lainnya berdasarkan UJGD (Uji Jarak Ganda Duncan). Pada tahap diferensiasi konsentrasi BAP dan 2,4-D secara terpisah berpengaruh terhadap peningkatan persentase kalus-kalus yang sehat. Hasil UJGD menunjukkan BAP 3 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l merupakan konsentrasi dengan persentase kalus tertinggi. Perlakuan 2,4-D 1,0 mg/l + BAP 3 mg/l menghasilkan kalus putih transparan, kompak dengan berat kalus tertinggi (0,49 g). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi paling optimal yang mampu menumbuhkan kalus koro benguk dengan berat tertinggi. Kalus terbaik dapat digunakan sebagai eksplan awal pada proses transformasi genetik yang melibatkan vektor *Agrobacterium*.

Kata kunci: BAP, 2,4-D, kalus, koro benguk

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Penegasan Istilah	5
D. Tujuan Penelitian	6
E. Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Tinjauan Pustaka	7
1. Biologi Koro Benguk	7
2. Induksi Kalus	9
3. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman	10
4. Kerangka Berfikir	18
B. Hipotesis.....	19
BAB III. METODE PENELITIAN	20
A. Lokasi dan Waktu Penelitian	20
B. Bahan Penelitian	20
C. Variabel Penelitian	20

D.	Rancangan Penelitian	21
E.	Alat dan Bahan	21
F.	Prosedur Penelitian	22
G.	Metode Pengumpulan Data.....	24
H.	Metode Analisis Data	25
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A.	Hasil Penelitian.....	26
B.	Pembahasan	36
BAB V.	PENUTUP	46
A.	Kesimpulan.....	46
B.	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA		47
LAMPIRAN-LAMPIRAN		51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar penelitian induksi kalus dengan sampel tanaman satu famili dengan koro benguk	16
2. Komposisi media tahap induksi dan diferensiasi	23
3. Rancangan penelitian induksi kalus	23
4. Respon pertumbuhan kalus dari eksplan setengah biji koro benguk terhadap jenis dan konsentrasi ZPT dan 2,4-D	26
5. Hasil analisis varian dua jalan parameter waktu terbentuk kalus	27
6. Hasil analisis varian dua jalan parameter persentase eksplan berkalus	28
7. Hasil analisis varian dua jalan parameter berat kalus per eksplan	28
8. Hasil perhitungan UJGD perlakuan BAP untuk berat kalus	29
9. Hasil pengamatan visual warna dan tekstur kalus setelah 30 hari penanaman	30
10. Respon pertumbuhan kalus subkultur media MS 0 parameter penanaman pada media MS 0	32
11. Hasil analisis varian dua jalan untuk parameter persentase eksplan berkalus sehat (%).....	32
12. Hasil perhitungan UJGD pada perlakuan BAP untuk persentase eksplan berkalus yang sehat pada media MS 0.....	33
13. Hasil perhitungan UJGD pada perlakuan 2,4-D untuk persentase eksplan berkalus yang sehat pada media MS 0.....	33
14. Hasil pengamatan visual warna dan tekstur kalus setelah 30 hari penanaman pada media MS 0	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi koro benguk	7
2. Struktur kimia 2,4-D	13
3. Struktur kimia IBA	14
4. Struktur kimia BAP.....	14
5. Diagram alir kerangka berfikir tahap induksi kalus	18
6. Diagram alir kerangka berfikir tahap diferensiasi kalus	19
7. Tahap-tahap memperoleh eksplan setengah biji	20
8. Induksi kalus eksplan setengah biji koro benguk	29
9. Warna dan tekstur kalus yang tumbuh pada media tanam.....	31
10. Warna dan tekstur kalus pada media MS 0.....	34
11. Hasil penyelamatan kalus dengan struktur berulang.....	35
12. Perkembangan kalus pada media BAP, IBA dan GA.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pengamatan parameter waktu terbentuk kalus	51
2. Hasil pengamatan parameter persentase eksplan berkalus	56
3. Hasil pengamatan parameter berat kalus per eksplan	61
4. Perhitungan hasil UJGD parameter berat kalus per eksplan	66
5. Hasil pengamatan visual warna dan tekstur kalus	68
6. Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus sehat	69
7. Perhitungan hasil UJGD parameter persentase eksplan berkalus yang sehat	73
8. Hasil pengamatan visual warna dan tekstur kalus pada MS 0	75
9. Keragaman warna dan tekstur kalus koro benguk	76
10. Perbandingan kalus koro benguk antara 2,4-D dan NAA	77
11. Penampilan visual kalus dengan butiran air hitam	78
12. Kalus koro benguk yang mengalami browning dan kontaminasi	79

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kacang-kacangan adalah sumber protein dan kalori alternatif, terutama untuk masyarakat yang tidak mampu memenuhi sumber protein hewani. Koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) merupakan kacang-kacangan yang tersebar luas di daerah tropis dan subtropis dan dijadikan sebagai sumber protein nabati (Bressani 2002). Kacang koro benguk biasa digunakan sebagai bahan baku pengganti kedelai dalam pembuatan tempe. Masyarakat banyak memanfaatkan biji koro benguk untuk dibuat tempe (tempe benguk), *geblek*, *besengek*, kecap (Rukmi 1999) dan untuk produksi susu benguk (Purwaningsih 2008).

Pada daerah-daerah tropis, koro benguk dimanfaatkan sebagai bahan makanan pengganti, pakan ternak, kopi, dan tempe namun pada beberapa negara digunakan untuk berbagai macam tujuan pengobatan (Chikagwa-Malunga *et al.* 2009). Semua bagian dari koro benguk umum digunakan untuk mengobati impotensi (Shukla *et al.* 2011) dan kanker (Sathyanarayanan & Arulmozhi 2007). Biji koro benguk memiliki bermacam-macam fungsi seperti peningkat kualitas spermatozoa (Winarni *et al.* 2011), antivenom (Fung *et al.* 2011) *rheumatoid arthritis*, diabetes melitus, atherosklerosis, kelainan saraf, analgesik, dan penyakit Parkinson (Bhaskar *et al.* 2011).

Koro benguk mempunyai potensi yang baik sebagai sumber protein alternatif dengan harga terjangkau di kalangan masyarakat luas. Vadivel dan Pugalenthi (2008) menyebutkan bahwa kandungan protein dan lipid pada biji mentah adalah 273,2 dan 60,61 g/kg, sedangkan kandungan total karbohidrat pada biji mentah sebesar 374,6 g/kg. Koro benguk juga mengandung berbagai macam komposisi mineral, asam lemak, dan vitamin. Kandungan mineral yang terdapat dalam koro benguk yaitu K, Ca, Mg, P, Fe, Mn, Zn, Cu (Mohan & Kalidass 2011).

Konsumsi koro benguk di Indonesia (Wonogiri dan Gunung Kidul Yogyakarta) lebih rendah dibandingkan dengan kacang-kacangan lainnya seperti kacang tanah dan kedelai. Rendahnya tingkat konsumsi tersebut disebabkan adanya kandungan anti-nutrisi seperti HCN dan L-Dopa (L-3,4 *Dihydroxyphenylalanine*) yang dapat menyebabkan keracunan apabila dijadikan bahan makanan atau pakan ternak (Widianarko *et al.* 2003). Daxenbichler *et al.* (1971) menyebutkan bahwa L-Dopa pada biji koro benguk merupakan prekursor neurotransmitter dopamin yang baik digunakan pada terapi penderita Parkinson, namun pemanfaatan koro benguk masih rendah dikalangan masyarakat.

Upaya perbaikan mutu tanaman dapat dilakukan melalui kajian fisiologis, molekuler dan pemuliaan tanaman secara konvensional. Perakitan varietas baru dalam rangka memperbaiki mutu tanaman banyak dilakukan dengan memanfaatkan teknologi transformasi genetik. Metode transformasi genetik tanaman merupakan metode alternatif untuk menghasilkan tanaman pangan hasil rekayasa genetik yang memiliki sifat-sifat unggul, di antaranya ketahanan terhadap hama dan penyakit, ketahanan terhadap herbisida, perubahan kandungan nutrisi, dan peningkatan daya simpan (Zulkarnain 2009).

Perbaikan mutu tanaman melalui transformasi genetik lebih dianjurkan melalui jalur embriogenesis somatik. Finer *et al.* (1997) mengatakan regenerasi tanaman melalui jalur embriogenesis somatik banyak digunakan untuk menghasilkan tanaman transgenik dengan memanfaatkan vektor *Agrobacterium* maupun dengan teknik penembakan partikel genetik. Keberhasilan transfer gen untuk menghasilkan tanaman dengan sifat tertentu sangat tergantung pada kemampuan eksplan membentuk embrio somatik dan kemampuan embrio untuk beregenerasi menjadi tanaman (Nolan & Rose 2010). Pada proses transformasi, penggunaan eksplan setengah biji dinilai lebih efisien dan lebih mudah dilakukan. Menurut penelitian Paz *et al.* (2006) pada kedelai, apabila dibandingkan dengan buku kotiledon penggunaan setengah biji memiliki potensi lebih tinggi dalam membentuk tanaman transgenik. Hal tersebut diduga karena seleksi pada *bar* gen setengah biji lebih efektif daripada buku kotiledon serta akibat dilakukannya pembelahan biji dengan melukai bagian

proksimal kotiledon. Penelitian embriogenesis kacang-kacangan di Indonesia lebih banyak dilakukan pada tanaman kedelai dan kacang tanah. Informasi tentang studi *in vitro* pada koro benguk masih sangat terbatas dan protokol embriogenesis pada tanaman koro benguk secara umum belum diketahui dengan jelas.

Langkah awal yang harus dilakukan untuk memulai proses embriogenesis ialah induksi kalus. Keberhasilan induksi kalus embriogenik suatu tanaman sangat bergantung pada hormon endogen dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang ditambahkan pada media tanam. Zat pengatur tumbuh tanaman memiliki peranan penting dalam mengontrol proses biologi dalam jaringan tanaman. Efektifitas zat pengatur tumbuh bergantung pada konsentrasi hormon endogen yang berinteraksi dengan hormon eksogen yang diberikan (Davies 2004). Induksi kalus embriogenik umumnya menggunakan auksin dalam konsentrasi tinggi atau auksin dengan aktivitas kuat. 2,4-*Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) adalah auksin kuat yang banyak digunakan untuk menginduksi dan meningkatkan frekuensi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut merupakan auksin sintetis yang cukup kuat dan tahan terhadap degradasi. *Benzylamino purin* (BAP) merupakan sitokinin sintetis aktif yang tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman serta sangat efektif dalam menstimulasi proliferasi dan induksi tunas (Gray 2005). Kombinasi 2,4-D dan BAP memberikan keberhasilan terbaik dalam induksi kalus setengah biji kedelai pada konsentrasi 4 mg/l BAP dan 4 mg/l 2,4-D (Radhakrishnan & Ranjitakumari 2007).

Menurut George & Sherrington (1984) penggunaan konsentrasi ZPT dalam jumlah seimbang antara sitokinin dan auksin menstimulasi eksplan untuk melakukan pembentukan kalus. Apabila konsentrasi sitokinin diperbesar maka mengarah pada pembentukan dan perbanyakan tunas. Handayani (2008) melaporkan bahwa kombinasi auksin dan sitokinin 5 mg/l pada eksplan kotiledon kedelai mampu membentuk kalus remah berwarna kuning-hijau transparan, mempunyai struktur embrio globular atau torpedo. Pada biji tanaman telegraph, kalus embriogenik dengan warna hijau gelap dan kompak terbentuk pada konsentrasi yang lebih rendah yaitu IAA 0,5 mg/l dan BA 1-2 mg/l (Devi & Narmathabai 2011). Perbedaan respon tersebut dapat disebabkan oleh faktor genotip eksplan, jenis eksplan, dan ZPT media

tanam. Seleksi, regenerasi *in vitro*, formulasi media yang efektif, konsentrasi yang tepat dan lingkungan kultur yang optimum perlu diketahui untuk mendukung keberhasilan penelitian.

Kalus yang mempunyai struktur embriogenik umumnya lebih berpotensi untuk dilanjutkan pada tahap diferensiasi. Proses diferensiasi tanaman membutuhkan serangkaian ZPT yang tepat untuk mengoptimalkan induksi tunas dari kalus-kalus embriogenik. Pada tahap ini BAP merupakan ZPT yang efektif digunakan dalam mendorong keberlanjutan perkembangan kalus (George & Sherrington 1984). Penambahan IBA pada medium berfungsi untuk membantu penumbuhan akar, sehingga penyerapan nutrisi diharapkan lebih optimal dan pertumbuhan semakin cepat. Beberapa penelitian menunjukkan adanya komponen lain yang ditambahkan pada medium untuk memaksimalkan perkembangan eksplan, diantaranya arang aktif, GA, maltosa, asam amino.

Penentuan konsentrasi yang tepat penting untuk mendapatkan respon optimum eksplan. Konsentrasi ZPT yang terlalu rendah tidak memunculkan respon induksi yang berarti dan konsentrasi yang terlalu tinggi justru menjadi toksik bagi tanaman (Gaba 2005). Kombinasi formula yang tepat antara 2,4-D, BAP, IBA atau komponen lain perlu diketahui untuk melihat respon induksi kalus dan perkembangan kultur koro benguk. Hasil penelitian diharapkan dapat berguna sebagai protokol awal sebelum masuk pada proses embriogenesis dan transformasi untuk perbaikan kualitas nutrisi, jumlah produksi, toleransi stress biotik dan abiotik atau berbagai pengembangan penelitian lainnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah yang diajukan adalah:

1. Apakah konsentrasi 2,4-D dan BAP berpengaruh terhadap respon pembentukan kalus koro benguk ?
2. Berapakah konsentrasi optimal 2,4-D dan BAP yang digunakan untuk induksi kalus koro benguk ?

C. Penegasan Istilah

a. Kalus

Kalus merupakan sekumpulan sel *amorphous*, aktif membelah, dan tersusun oleh sel-sel parenkim dengan ikatan renggang satu sama lain (Zulkarnain 2009). Munculnya kalus diindikasikan dengan adanya sekumpulan sel berwarna putih atau bening dengan lebar minimal 1-2 mm. Indikator pembentukan kalus yang diamati ialah hari berkalus, persentase kalus, berat kalus dan morfologi kalus.

b. Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.)

Eksplan yang digunakan adalah koro benguk dari Mojoreno Wonogiri yang dipanen pada musim kemarau bulan Maret, dengan ukuran biji sedang (1-1,5 cm).

c. Zat Pengatur tumbuh (ZPT)

Pada penelitian ini, ZPT yang digunakan pada tahap awal induksi kalus ialah auksin 2,4-D dan sitokinin BAP. Tahap berikutnya menggunakan medium MS dasar dilanjutkan dengan melibatkan ZPT BAP, IBA dan GA.

d. Eksplan setengah biji

Eksplan setengah biji adalah eksplan yang diperoleh dari biji yang dibuang kulitnya kemudian dibelah secara longitudinal menjadi dua dan dibuang aksis embrionya (Paz *et al.* 2006).

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D dan BAP terhadap respon pembentukan kalus pada koro benguk.
2. Mendapatkan konsentrasi terbaik 2,4-D dan BAP untuk induksi kalus koro benguk.

E. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi bagi para peneliti yang akan melakukan pengembangan induksi embrio somatik pada koro benguk dalam rangka perbaikan mutu melalui proses transformasi maupun keperluan lain.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. Biologi Koro Benguk

Menurut *United States Department of Agriculture* (2008), klasifikasi koro benguk berdasarkan taksonomi adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Fabales
Famili : Fabaceae
Genus : *Mucuna*
Spesies : *Mucuna pruriens* (L.) DC.
Nama daerah : Koro benguk (Jawa)



Gambar 1. Morfologi koro benguk: a. Daun; b. biji (Ariani 2016)

Koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) adalah tumbuhan tahunan yang mampu merambat panjang mencapai 15 meter. Bentuk daunnya bulat telur dan biasanya terdapat rambut-rambut halus pada kedua sisinya. Bunga memiliki tangkai pendek dengan brachtea. Kepala bunga berbentuk malai dan tersusun memanjang 15-32 mm

dengan dua, tiga atau banyak bunga berwarna putih atau ungu. Kaliks gamosepalus dan berambut halus. Korola berbentuk papilionaceus berwarna keunguan. Letak ovul sessil, stamen diadelphus dan anther dimorphous. Biji berwarna abu-abu sampai hitam dengan panjang 15-20 mm dan lebar 7-15 mm. Kulit biji bertekstur keras, tebal dan mengkilat. Pada tahap pematangan buah, polong dapat berkembang dengan panjang 4-13 cm, lebar 1-2 cm dan mampu membawa sampai tujuh biji. Koro benguk merupakan tumbuhan daerah tropis yang terkenal karena rambut polongnya yang menyebabkan rasa gatal jika kontak langsung dengan kulit. Polong diselimuti dengan rambut-rambut yang menyebabkan gatal jika kontak langsung dengan kulit (Kavitha & Thangamani 2014). Hal ini dikarenakan adanya senyawa-senyawa yang terdapat di dalamnya seperti protein, mucunain dan serotonin (Mohan & Kalidass 2011). Biji koro benguk biasanya mengkilap dengan beragam warna misalnya abu-abu, hitam atau bercak coklat. Berat kering biji biasanya 55-85 g/100 biji (Vijayambika *et al.* 2011).

Kandungan nutrisi koro benguk diketahui tidak jauh berbeda dengan kedelai. Vadivel dan Pugalenth (2008) menyebutkan bahwa kandungan protein dan lipid pada biji mentah adalah 273,2 dan 60,61 g/kg, sedangkan kandungan dari total karbohidrat pada biji mentah sebesar 374,6 g/kg. Pugalenth *et al* (2005) menyebutkan bahwa koro benguk mengandung 25,4-29,6% protein, 31,2-39,5% pati, asam amino, asam lemak, dan mineral. Koro benguk juga mengandung berbagai macam komposisi mineral dan asam lemak, vitamin. Menurut Mohan dan Kalidass (2011) dalam biji koro benguk memiliki kandungan mineral K 1498-1600 mg/100g, Ca 548-740 mg/100g, Mg 440-537 mg/100g, P 410-583 mg/100g, Fe 4,45-7,56 mg/100g, Mn 5,55-8,36 mg/100g, Zn 1,42-2,63 mg/100g, Cu 0,35-0,57 mg/100g.

Biji koro benguk juga mengandung beberapa faktor anti-nutrisi seperti L-Dopa, fenol bebas, tannin, inhibitor tripsin dan kemotripsin, anti-vitamin, inhibitor protease, asam fitat, saponin, HCN 10-800 mg per 100 g bahan (Vadivel & Janardhanan 2000). Biji koro benguk rata-rata mengandung konsentrasi L-dopa 48,9 g/kg. Prakash dan Tewari (1999) menyebutkan bahwa konsentrasi L-dopa pada biji koro berkisar antara 3,6-4,2% dan 40-60 g/kg (Chikagwa-Malunga *et al.* 2009).

Konsumsi biji koro benguk tanpa melalui pemrosesan yang benar dapat menyebabkan efek keracunan seperti mual, muntah, nafsu makan hilang, halusinasi, anoreksia, dan depresi (Vadivel dan Pugalenthil 2008).

Semua bagian dari koro benguk dapat digunakan untuk pengobatan antiglikemik, antimikroba, antioksidan, antivenom, gangguan urin dan saraf, konstipasi, gangguan menstruasi, edema, demam, tuberkulosis, sariawan, dan Parkinson. Kandungan asam amino non protein seperti L-Dopa pada biji koro, dalam dunia medis diekstraksi dan diproduksi sebagai obat komersial untuk perawatan pada penderita penyakit Parkinson (Kavitha & Thangamani 2014).

2. Induksi Kalus

Pada teknik *in vitro*, sel atau jaringan tanaman yang diisolasi sebagai eksplan distimulasi untuk memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap menggunakan media dan lingkungan tumbuh yang sesuai. Kultur *in vitro* banyak diaplikasikan pada berbagai macam tanaman untuk tujuan tertentu, seperti mendapatkan bibit dalam jumlah banyak dengan waktu singkat atau untuk keperluan lain seperti produksi metabolit sekunder dan peningkatan keragaman genetik.

Proses regenerasi tanaman dapat dilakukan melalui organogenesis ataupun embriogenesis (Pierik 1997). Beberapa peneliti menyebutkan bahwa untuk keperluan perbaikan mutu tanaman cara embriogenesis lebih banyak digunakan karena dapat secara jelas mengetahui kualitas eksplan yang dikulturkan. Embriogenesis umumnya terdiri dari beberapa tahapan, meliputi tahap induksi, proliferasi, diferensiasi dan maturasi, serta perkecambahan embrio (Zulkarnain 2009). Embrio yang berasal dari sel somatik mampu berkembang menjadi planlet muda melalui beberapa perubahan morfologi, yaitu pro-embrio berupa kelompok kecil sel-sel meristematis; fase globular berupa kelompok sel yang membesar; fase hati yang memiliki ciri berupa tiga buah cuping dan bentuk torpedo yang merupakan pembesaran embrio bentuk hati (George & Sherrington 1984).

Menginduksi kalus merupakan salah satu langkah awal yang penting untuk dilakukan dalam kultur *in vitro*. Semua organ tanaman seperti akar, batang, daun,

bunga dan yang lainnya dapat dijadikan sebagai eksplan untuk induksi kalus. Apabila kalus sulit diinduksi maka perlu ditinjau ulang eksplan yang digunakan. Pembelahan sel, pembentukan organ dan embrio sangat dipengaruhi oleh tingkat hormon endogen dan eksogen, tipe eksplan *juvenile* atau dewasa, dan posisi eksplan (Iantcheva *et al.* 2006). Konsentrasi auksin yang diperlukan untuk menginduksi sel yang embriogenik sangat tinggi dibandingkan keperluan auksin pada pertumbuhan sel normal (Gaspar *et al.* 1996). George & Sherrington (1984) menyebutkan bahwa untuk mengarah pada pembentukan kalus, konsentrasi auksin dan sitokinin harus seimbang. Posisi eksplan dalam media induksi akan berpengaruh pada jumlah embrio yang dihasilkan, dimana eksplan yang ditanam dengan posisi bagian abaksial yang menyentuh media mempunyai jumlah embrio yang lebih banyak dibanding jika eksplan ditanam dengan posisi sebaliknya (Finer *et al.* 1997). Hal tersebut berlawanan dengan pernyataan Konate *et. al* (2013) bahwa eksplan dengan bagian adaksial yang menempel media memiliki frekuensi pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan abaksial. Keadaan ini menunjukkan bahwa keberhasilan inisiasi kalus juga ditentukan oleh beberapa faktor lain seperti genotip, komposisi medium, suhu, dan pencahayaan (Bhojwani & Razdan 1996).

3. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman

Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh eksogen dan hormon pertumbuhan yang diproduksi sel tanaman secara endogen. Zat pengatur tumbuh dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu golongan auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, dan etilen (Zulkarnain 2009).

Zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin (Davies 2004). Auksin merupakan sekelompok senyawa yang secara umum berfungsi merangsang pemanjangan sel-sel pucuk (Zulkarnain 2009). Taiz & Zeiger (1998) menyebutkan bahwa salah satu auksin endogen yang banyak ditemukan pada tanaman ialah *Indole-3-acetic-acid* (IAA) yang disintesis dari triptofan pada bagian tanaman tertentu yaitu primordial daun, daun muda, serta buah

dan biji yang sedang berkembang. Auksin endogen yang lain ialah 4-kloro IAA, *indole-3-butyric acid* (IBA), *4-Chloroindole-3-acetic-acid* (4-CI-IAA) dan *Phenylacetic acid* (PAA). Auksin sintetik yang sering digunakan dalam kultur jaringan yaitu, *α -naphthaleneacetic acid* (NAA), *naphtoxyacetic acid* (NOA), *dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) dan 2,4,5-T (*trichlorophenoxyacetic acid*), *2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid* (dicamba) (Bhojwani & Razdan 1996). Auksin sintetik 2,4-D dan dicamba banyak digunakan sebagai herbisida pada berbagai bidang pertanian dan hortikultura (Taiz & Zeiger 2010).

Auksin merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang berperan penting dalam proses perkembangan tanaman, termasuk di dalamnya pembesaran dan pembelahan sel, diferensiasi jaringan pembuluh, merangsang pertumbuhan kalus, merangsang dominansi apikal, pembentukan akar dan embrio somatik (Davies 2004). Auksin berpengaruh pula untuk menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas aksilar, namun kehadirannya dalam medium kultur diperlukan untuk meningkatkan embriogenesis somatik pada kultur suspensi sel (Pierik 1997). Pada konsentrasi rendah ($< 1\mu\text{M}$), auksin akan menginisiasi akar, jika digunakan dalam konsentrasi tinggi maka akan menginisiasi terjadinya kalus. Auksin dibutuhkan dalam menginduksi pembentukan sel embrionik dengan menginisiasi aktivitas *differential gene* dan memanipulasi sekumpulan gen untuk meningkatkan populasi sel embrionik melalui pembelahan sel secara berulang-ulang, serta menstimulasi terjadinya diferensiasi sel dan terjadinya embrio (Gray 2005).

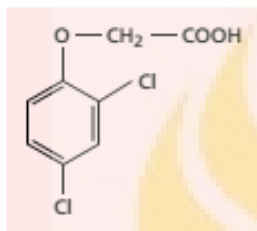
Kinerja auksin pada perkembangan sel tanaman dapat dipahami melalui mekanisme polar transport yang berkaitan dengan *auxin influx* dan *auxin efflux*. Auksin masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui membran plasma menuju sitosol. Ketika berada dalam sitosol yang memiliki pH 7,2 auksin mendominasi dalam bentuk anion kemudian keluar melalui *auxin anion efflux carrier* (Taiz & Zeiger 2010). Pompa proton pada membran plasma digerakkan oleh ATP dan mentransfer H^+ pada dinding sel membentuk H^+ -ATPase menyebabkan pH menjadi asam (pH 5). Aktivitas ATP dalam menggerakkan pompa proton menyebabkan terjadinya perbedaan pH bagian dalam dan luar sel. Akibat adanya ion H^+ menyebabkan

aktifnya enzim tertentu sehingga memutuskan beberapa ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Air menjadi mudah masuk melalui membran sel dengan cara osmosis karena dinding sel menjadi lebih plastis dan sel bertambah besar (Campbell & Reece 2008). Davies (2004) juga menyebutkan bahwa auksin mengaktifkan proton ATPase pada membran plasma dan mengakibatkan proton terpompa keluar, terjadinya pelenturan dinding sel dan aktifnya gen-gen tertentu yang berkaitan dengan pertumbuhan sel.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus berbagai jaringan tanaman. Kajian molekuler tentang kinerja auksin terdiri dari serangkaian proses seluler yang rumit. Auksin bekerja dengan melibatkan *Auxin-Binding Protein* (ABP) yang memegang kendali terhadap respon pemanjangan sel dan *Auxin Response Factor* (ARF) berupa *ARF3/ETT*, *ARF5/MP*, *ARF7/NPH4* yang termasuk faktor transkripsi (Napier *et al.* 2002). Mekanisme kerja auksin secara singkat dapat dipahami melalui sistem umpan balik negatif. Auksin akan mengaktifasi *Aux/IAA* yang mengandung TGTCTC *AuxRE* dan mengakibatkan jumlah protein dan mRNA meningkat. Ketika konsentrasi auksin menurun, *Aux/IAA* akan melakukan akumulasi untuk menjaga kestabilan sel dan menghentikan respon dengan membentuk dimer baru bersama ARF untuk menekan gen-gen tertentu. Ketika konsentrasi auksin ditingkatkan, *Aux/IAA* menjadi tidak stabil akibat degradasi yang terjadi dengan cepat dan menyebabkan gagalnya proses akumulasi. Kondisi tersebut menyebabkan *Aux/IAA* berhenti melakukan penekanan gen sehingga auksin berekspresi (Hagen *et al.* 2004).

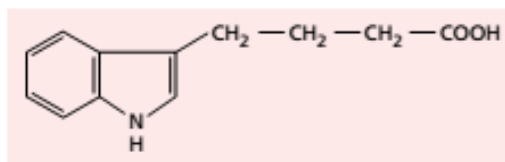
Auksin 2,4-D merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada proses pengkalusan karena aktivitasnya kuat untuk memacu proses differensiasi sel, menekan organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus. Aktivitas 2,4-D yang kuat dan optimal disebabkan gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen (Gaspar *et al.* 1996). Iantcheva *et al.* (2006) menyebutkan 2,4-D dapat mencapai konsentrasi intraseluler tertinggi dan biasanya menghasilkan pembentukan embrio frekuensi tinggi. Konsentrasi 2,4-D yang tinggi menyebabkan terjadinya pembelahan asimetrik dan mengarahkan pada pembentukan embrio (Gray 2005).

Auksin 2,4-D juga berperan penting dalam proses dediferensiasi dan diferensiasi. Gaspar *et al.* (1996) menyatakan bahwa auksin 2,4-D merupakan auksin yang mempunyai sifat lebih aktif dalam mempengaruhi pertumbuhan tanaman dibandingkan dengan IAA karena reaksi enzimatik dan fotooksidasi. Pierik (1997) menganjurkan untuk membatasi penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan.



Gambar 2. Struktur kimia 2,4-D (Taiz & Zeiger 2010).

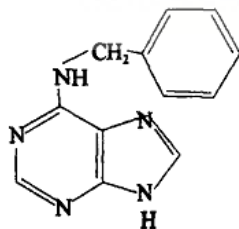
Kemampuan jaringan membentuk akar sangat bergantung pada ZPT auksin yang terdapat dalam media. Apabila dibandingkan dengan IAA dan NAA, *Indole-3-butyric acid* (IBA) merupakan salah satu auksin terbaik dalam merangsang pembentukan akar. NAA diketahui mempunyai stabilitas lebih besar dan mobilitas dalam tanaman rendah, tetapi batas konsentrasi optimumnya sangat sempit sehingga dapat menimbulkan kerugian apabila belum diketahui konsentrasi yang tepat untuk suatu tanaman. Sedangkan IAA bersifat lemah dan lebih mudah menyebar ke bagian-bagian lain sehingga efektivitas menjadi hilang (Gaba 2005). Hormon IBA selain digunakan untuk merangsang pengakaran juga digunakan untuk menambah daya kecambah, merangsang perkembangan buah, dan mendorong kegiatan kambium (Pierik 1997). Penggunaan IBA untuk merangsang pembentukan akar pada eksplan dimaksudkan untuk mempermudah penyerapan nutrisi pada media tanam sehingga perkembangan menjadi lebih stabil.



Gambar 3. Struktur kimia IBA (Taiz & Zeiger 2010).

Zat pengatur tumbuh sitokinin juga diperlukan untuk perkembangan embriogenesis. Sitokinin merupakan derivat adenin yaitu suatu basa purin yang terdapat pada DNA dan RNA. Sitokinin secara umum mempunyai kemampuan memicu pembelahan sel dan mempengaruhi diferensiasi karena sitokinin menstimulasi RNA dan sintesis protein yang terlibat pada pembelahan sel. Penggunaan bersama dengan auksin dapat mendorong pembelahan sel dan menentukan arah terbentuknya diferensiasi sel (Gaba 2005).

Sitokinin endogen yang terdapat dalam tanaman yaitu zeatin, sedangkan sitokinin sintetik yang paling banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah BAP (*benzylamino purin*), 2-ip (*isopentyl-adenine*), kinetin, thidiazuron (TDZ) (Bhojwani & Razdan 1996). Sitokinin sintesis golongan BAP merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat mendorong proses pembelahan sel. Selain itu, BAP merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan memiliki daya rangsang lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman (George & Sherrington 1984). Gaspar (1996) menambahkan bahwa BAP memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus, sehingga BAP merupakan sitokinin yang paling aktif.



Gambar 4. Struktur kimia BAP (Taiz & Zeiger 2010).

Penggunaan ZPT menjadi hal yang sangat penting dalam pembentukan dan pertumbuhan kalus. Jika konsentrasi auksin terlalu rendah proses induksi tidak akan berlangsung maksimal sedangkan jika konsentrasi terlalu tinggi dapat menjadi racun bagi eksplan tanaman yang dikulturkan. Hofmann *et al.* (2004) menyatakan bahwa penggunaan jenis dan konsentrasi auksin yang berbeda pada medium kultur akan menyebabkan perbedaan morfologi kalus. Induksi kalus *faba bean* menggunakan 2,4-D di bawah 4 mg/l dilaporkan mampu membentuk kalus remah, sedangkan pada konsentrasi di bawah 1 mg/l membentuk kalus tidak remah (Almaghribi 2014). Modifikasi perlakuan antara BAP 4 mg/l dan 2,4-D 4 mg/l pada induksi kalus eksplan setengah biji *Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3, memperlihatkan perubahan warna pada eksplan menjadi kuning, hijau terang, hijau dan hijau gelap.

Efek penggunaan sitokinin sering dipengaruhi oleh keberadaan auksin. Pada pembentukan kalus, auksin dan sitokinin mempunyai peran yang berbeda. Auksin berperan memudahkan pengembangan sel dengan cara pelenturan dinding sel sehingga air dan nutrisi dapat masuk dengan mudah dan kebutuhan sel untuk membenteng tercukupi. Sitokinin berperan dalam proses sitokinesis atau pembelahan sel. Sitokinin bekerja dengan mempercepat durasi pada salah satu fase yaitu fase G2 menuju fase M. Pada fase tersebut terjadi persiapan material untuk sintesis, dengan durasi G2 yang lebih singkat menjadikan laju sintesis protein meningkat dan sel lebih cepat mengalami pembelahan (Taiz & Zeiger 2010). Sitokinin dilaporkan melakukan regulasi pada fase G1 menuju fase S melalui siklin tipe D (*CycD3*) dan banyak berekspresi pada jaringan meristem (Gray 2005).

Peranan sitokinin dalam siklus sel berkaitan dengan *on* atau *off* nya CDK. Pada tahap G2 sitokinin masuk dan menstimulasi *cdc2* inaktif untuk berubah pada status aktif. Aktivasi CDK (*cdc2*, *cdk4*, dan *cdk6*) pada transisi G2-M dicapai dengan cara bergabung pada siklin spesifik dan diikuti dengan proses fosforilasi. Komplek yang dibentuk untuk mengaktifasi CDK pada posisi *on* ialah gabungan dari siklin B dengan *cdc2* pada tahap akhir G2. Proses pengaktifan *cdc2* membutuhkan fosforilasi tambahan berupa *wee 1* protein kinase. Pada tahap awal G1 sitokinin menstimulasi *CycD3* inaktif untuk melakukan penggabungan dengan *cdk4* atau *cdk6*. Kemudian

cdk4 dan cdk6 melakukan fosforilasi dengan melibatkan *cyclin activating kinase* (CAK) dan *CycD3* menjadi aktif. Penggunaan sitokinin eksogen dapat menaikkan transkrip *cdc2* dan *CycD3*. Ekspresi *CycD3* yang semakin meningkat inilah yang menjadi penyebab meningkatnya proliferasi sel (D'Agostino & Kieber 2002).

Tabel 1. Penelitian induksi kalus pada tanaman satu famili dengan koro bengkuk

No	Peneliti	Tanaman	Jenis eksplan	Konsentrasi
1	Konate <i>et al.</i> (2013)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Kotiledon	2,4-D, Pic, NAA 0,5-10 mg/l ¹ & BAP, KIN, TDZ 0,1-1 mg/l
2	Das (2011)	<i>Acacia catechu</i> , <i>Acacia arabica</i> , <i>Hardwickia binata</i> , & <i>Dalbergia sisso</i>	Polong muda	2,4-D & NAA 0.5-3.0 mg/l ¹ , BA & Kinetin 0.25-2 mg/l ¹
3	Devi & Narmathabai (2011)	<i>Desmodium motorium</i>	Kotiledon	BA, IAA, NAA & 2,4-D 0,5 mg/l ¹ , 1 mg/l ¹ , 2 mg/l ¹ , 3 mg/l ¹
4	Kaviraj <i>et al.</i> (2006)	<i>Vigna radiata</i>	Kotiledon dewasa	2,4-D 10-15 mg/l ¹ , NAA 7,5-17,5 mg/l ¹
5	Radhakrishnan & Ranjithakumari (2007)	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. CO3	Half seed	BAP 1-5 mg/l ¹ + 2,4-D 1-5 mg/l ¹
6	Handayani (2008)	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Kotiledon muda	2,4-D 10-40 mg/l ¹ & NAA 5-10 mg/l ¹

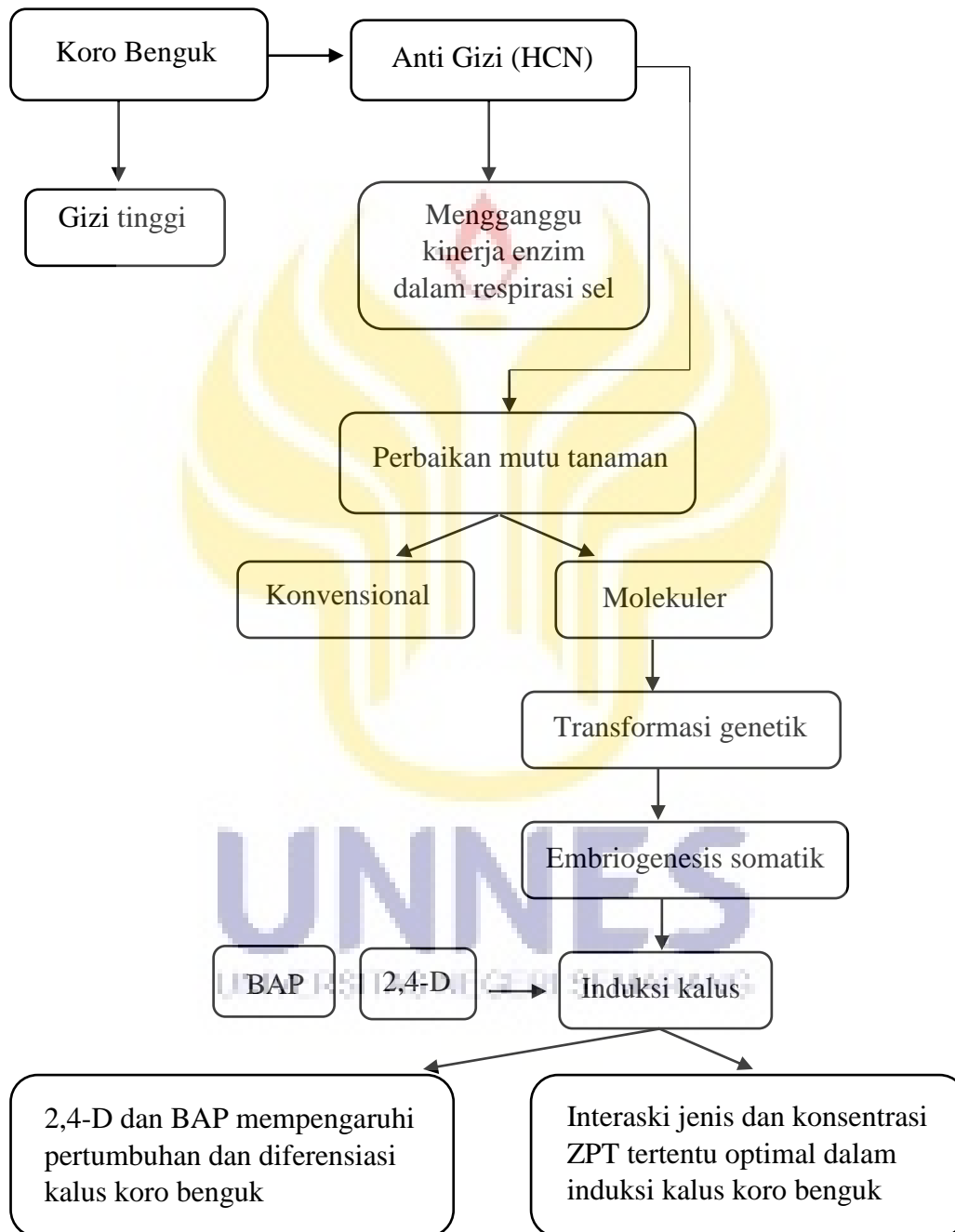
Respon tanaman terhadap zat pengatur tumbuh tidak selalu sama karena ZPT endogen masing-masing tanaman berbeda-beda. Arah perkembangan dan respon yang muncul dipengaruhi oleh jenis tanaman, fase pertumbuhan tanaman, jenis dan konsentrasi ZPT. Penelitian Handayani (2008) berbagai genotip kedelai yang diinduksi pada 10 mg/l 2,4-D dan NAA secara umum mempunyai tekstur kalus lembek dan berwarna pucat sampai coklat. Penurunan konsentrasi 2,4-D dan NAA menjadi 5 mg/l menghasilkan kalus remah berwarna kuning-hijau transparan, berstruktur embrio globular dengan kalus embrionik rendah.

Induksi kalus pada kotiledon *Vigna subterranea* menunjukkan bahwa hanya diperlukan 2,4-D atau Pikloram tunggal sebesar 0,5 mg/l untuk menghasilkan frekuensi pengkalusan sebesar 98% (Konate *et al.* 2013). Penelitian yang dilakukan Das (2010) pada *Acacia catechu*, *Acacia arabica*, *Hardwickia binata*, dan *Dalbergia sissoo* menggunakan kotiledon muda membutuhkan 2.0 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin untuk membentuk kalus embrionik remah. Penelitian Kaviraj (2006) pada eksplan kotiledon dewasa *Vigna radiata* menggunakan 2,4-D dan NAA memperlihatkan persentase terbaik pengkalusan 100% pada konsentrasi 2,4-D 10 mg/l atau NAA 15 mg/l, namun diferensiasi embrio masih rendah. Sedangkan penelitian Devi & Narmathabai (2011) pada kotiledon *Desmodium motorium* menggunakan IAA 0,5 mg/l dan BA 1-2 mg/l memperlihatkan pembentukan kalus embriogenik terbaik dengan warna hijau gelap dan kompak.

Keberhasilan proses induksi kalus pada hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa masing-masing tanaman membutuhkan kisaran penggunaan ZPT yang berbeda-beda. Hal tersebut dikarenakan kandungan hormon endogen pada setiap tanaman memang tidak sama. Penelitian-penelitian tersebut menjadi pertimbangan untuk penentuan konsentrasi pada penelitian koro benguk sehingga digunakan 2,4-D dengan konsentrasi 0,5-2 mg/l dan BAP dengan konsentrasi 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l.

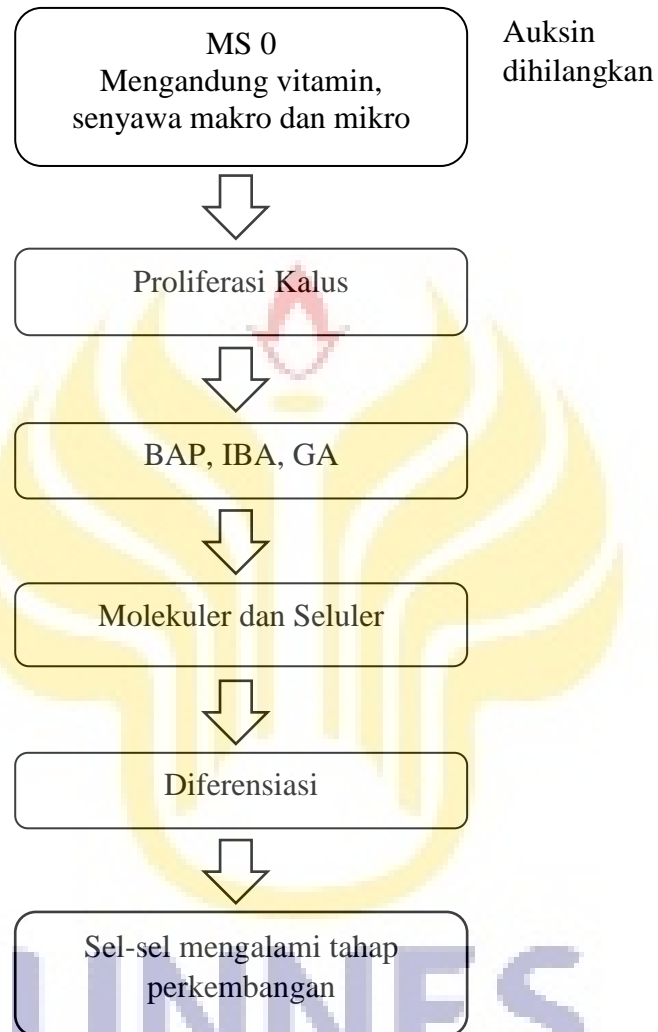
4. Kerangka berfikir

Berikut ini adalah kerangka berfikir penelitian tahap induksi kalus yang diperoleh berdasarkan tinjauan pustaka yang telah diuraikan sebelumnya.



Gambar 5. Kerangka berfikir respon pembentukan kalus koro benguk pada perlakuan 2,4-D dan BAP (Tahap I)

Berikut ini adalah kerangka berfikir perkembangan kalus yang diperoleh berdasarkan tinjauan pustaka yang telah diuraikan sebelumnya.



Gambar 6. Kerangka berfikir diferensiasi kalus subkultur pada MS0 (Tahap II)

B. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka berfikir diatas maka hipotesis yang diajukan adalah:

1. Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi kalus koro benguk.
2. Interaksi jenis dan konsentrasi ZPT tertentu optimal dalam induksi dan perkembangan kalus koro benguk.



BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Konsentrasi BAP, 2,4-D dan interaksi keduanya tidak berpengaruh terhadap waktu terbentuknya kalus dan persentase eksplan berkalus, namun konsentrasi BAP berpengaruh terhadap berat kalus yang diinduksi dari eksplan setengah biji koro benguk. Pada tahap differensiasi konsentrasi BAP dan 2,4-D secara terpisah berpengaruh terhadap peningkatan persentase kalus-kalus yang sehat. Konsentrasi yang paling optimal untuk pertumbuhan kalus eksplan setengah biji koro benguk adalah BAP 3 mg/l + 2,4-D 1,0 mg/l.

B. Saran

Munculnya butiran air berwarna hitam pada permukaan eksplan perlu diketahui dan diantisipasi lebih dini agar perkembangannya dapat lebih stabil. Konsentrasi sitokinin yang digunakan pada tahap lanjut juga perlu ditingkatkan agar proembrio dan embrio globular lebih mudah terstimulasi ke arah pembentukan tunas.

DAFTAR PUSTAKA

- Almaghriby OA. 2014. Effect of growth hormone 2,4-D on some callus traits of different faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars. *Life Sci J*, 11(11): 98-102.
- Bhaskar A, Nithya V & Vidhya VG. 2011. Phytochemical evaluation by GC-MS and antihyperglycemic activity of *Mucuna pruriens* on Streptozotocin induced diabetes in rats. *J Chem Pharm Res*, 3(5): 689-696.
- Bhojwani SS & Razdan MK. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Amsterdam: Elsevier. 779 hal.
- Bressani R. 2002. Factors influencing nutritive value in food grain legumes: *Mucuna* in comparison to other grain legumes. In: Flores B, Eilitta M, Myhrman R, Carew LB, & Carsky RJ (Eds) *Mucuna as a food and feed: Current Uses and the Way Forward. Proceedings of an international workshop held April 26-29, 2000 in Tegucigalpa, Honduras* pp. 164-188.
- Campbell NA & Reece JB. 2008. *Biology 8th edition*. Jakarta: Erlangga. 486 hal.
- Chikagwa-Malunga SK, Ade S, Ogan AT, Sollenberger LE, Badinga LK, Szabo NJ & Littell RC. 2009. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148(1): 34-50.
- D'agostino & Kieber JJ 1999. Molecular mechanism of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol*, 2(5):359-364.
- Das P. 2011. Somatic embryogenesis in four tree legumes. *Biotech. Res Int*, pp.1-8
- Davies PJ. 2004. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. 776 hal.
- Daxenbichler ME, Van Etten CH, Hallman EA, Earle FR & Barclay AS. 1971. Seeds as sources of L-Dopa. *J Med Chem*, 14: 463.
- Devi BC & Narmathabai V. 2011. Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. *PCTOC*, 106: 409-418.
- Finer JJ, Santarem ER & Pelissier B. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 33: 13-19.

- Fung SY, Tan NH, Sim SM, Marinello E, Guerranti & Aguiyi JC. 2011. *Mucuna pruriens* Linn. Seed extract pretreatment protects against cardiorespiratory and neuromuscular depressant effects of *Naja sputatrix* (Javan spitting cobra) venom in rats. *Indian J Exp Biol*, 49: 254-259.
- Gaba VP. 2005. Plant Growth Regulators in Tissue Culture and Development. 87-99. In: RN Trigiano and DJ Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DA and Thorpe TA. 1996. Review: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev Biol Plant*, 32: 272-289.
- George EF & Sherrington PD. 1984. *Propagation by Tissue Culture*. London: Exegetics Ltd
- Gomez KA & AA Gomez. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian Ed.2*. Terjemahan Endang S & Justika SB. Jakarta: UI Press.
- Gray DJ. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue: nonzygotic embryogenesis, 187-200. In: RN Trigiano and DJ Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- Handayani, T. 2008. *Potensi Embriogenesis Beberapa Genotipe Kedelai Toleran dan Peka Naungan*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian IPB.
- Hagen G, Guilfoyle TJ & Gray WM. 2004. Auxin signal transduction. In: Davies PJ (Eds.) *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher.
- Hofmann N, Nelson RL, & Korban SS. 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *PCTOC*, 77: 157-163.
- Iantcheva A, Vlahova M & Atanasov A. 2006. Somatic embryogenesis in genera *Medicago*: an overview. In: Mujib A & Samaj J (Eds): *Somatic Embryogenesis*. Germany: Springer-Verlag Berlin Hiedelberg. pp. 285-304.
- Kaviraj CP, Kiran G, Venugopal RB, Rao S dan Kishor PB. 2006. Embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explant of *Vigna Radiata* (L.) Wilezek – a recalcitrant grain legume. *In vitro Cell Dev Biol*. 134-138.
- Kavitha C & Thangamani C. 2014. Amazing bean *Mucuna pruriens*: A comprehensive review. *J Med Plant Res*, 8(2): 138-143.
- Konate S, Kone M, Kouakou HT, Kouadio JY & Zouzou M. 2013. Callus induction and proliferation from cotyledon explants in bambara groundnut. *African Crop. Sci. J*, 21(3): 255-263.

- Mohan VR & Kalidass C. 2011. Nutritional and antinutritional composition of itching bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC var. Pruriens): an underutilized tribal pulse in Western Ghats, Tamil Nadu; *J Trop Subtrop Agroecosystems*, 14: 279-293.
- Napier RM, David KM, Perrot RC. 2002. A short history of auxin binding protein. *Plant Mol Biol* 49: 339-348.
- Nolan KE & Rose RJ. 2010. Plant regeneration-somatic embryogenesis. 39-59. In: Davey MR & Anthony P (Eds). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. UK: Wiley-Blackwell Publisher. 345 hal.
- Prakash D & Tewari SK. 1999. Variation on L-Dopa contents in *Mucuna* species. *J. Med Arom Plant Sci India*, 21: 343-346.
- Paz MM, Juan CM, Andrea BK, Tina MF, & Kan W. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25: 206-213.
- Pierik RLM. 1987. *In Vitro Culture Higher Plant*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. 346 hal.
- Pugalenthi M, Vadivel V & Siddhuraju P. 2005. Alternative food feed perspectives of an under-utilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis - A review. *Plant Foods Hum Nutr*, 60: 201-218.
- Purwaningsih D. 2008. *Teknologi Pembuatan Susu Dari Tempe Benguk*. FMIPA: UNY.
- Radhakrishnan R & Ranjitakumari BD. 2007. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *J Agric Technol*, 3(2): 287-297.
- Rukmi. 1999. Pengaruh berbagai konsentrasi tempe gembus dalam ransum pakan terhadap profil lipid serum darah mencit. [Tesis]. Semarang: Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
- Sathyanarayanan L & Arulmozhi S. 2007. *Mucuna pruriens* Linn. A comprehensive review. *Pharmacognosy Rev*, 1: 157-162.
- Shukla KK, Mahdi AA, Ahmad MK, Jaiswar SP, Shankwar SN & Tiwari SC. 2011. *Mucuna pruriens* reduces stress and improves the quality of semen in infertile men. *Advance Access Pub*, 7(1): 137-144.
- Taiz L & Zeiger E. 2003. *Plant physiology 3rd edition*. Massachusetts: Sinauer Associates. 623 hal.

- [USDA] United States Department of Agriculture. 2008. Plant profile for *Mucuna pruriens* (L.) DC. Online at <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=MUPR> [diakses tanggal 13 januari 2014].
- Vadivel V & Janardhanan K. 2000. Nutritional and antinutritional composition of velvet bean: An underutilized food legume in South India. *Int J Food Sci Nutr*, 51: 279-287.
- Vadivel V & Pugalenti M. 2008. Removal of antinutritional/toxic substances and improvement in the protein digestibility of velvet bean seeds during various processing methods. *J Food Sci Technol*, 45: 242-246.
- Vijayambika C, Jugadeesan M, A Saravana Ganthi. 2011. Comparative anatomical studies on seed of *Mucuna adans.* and *Canavalia* DC. Spesies. *Indian J Nat Prod Resour*, 2(1): 81-87.
- Widianarko B, Pratiwi R, Soedarini, Dewi R, Wahyuningsih S & Sulistyani N. 2003. *Menuai Polong*. Grasindo: Jakarta
- Winarni S, Rina J, Bangbang P & Alfiyah H. 2011. Fraksi etanol 96% biji koro benguk (*M. pruriens*) sebagai peningkat kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*). *J Kesehatan Reproduksi*, 1(2): 60-66.