



Optimasi Konsentrasi 2,4-D, Ba, dan Lama Penyinaran untuk Memacu Regenerasi Tunas dari Kalus Kedelai

Optimization of 2,4-D Concentration, Ba, and Long Irradiation to Promote Regeneration Buds from Callus of Soybean

✉ **Intan Kristanti, Noor Aini Habibah, Lina Herlina**

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Februari 2013
Disetujui Maret 2013
Dipublikasikan Maret 2013

Keywords:

2,4-D, BA, irradiation, bud regeneration, Soybean callus

Abstrak

Alternatif untuk mengatasi kualitas kedelai yang rendah yaitu perbaikan sifat genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Benzyl Adenine (BA) serta lama penyinaran dan interaksinya terhadap regenerasi tunas dari kalus kedelai, dan untuk menentukan interaksi faktor-faktor yang paling optimal dalam regenerasi tunas dari kalus kedelai. Konsentrasi 2,4-D dan BA masing-masing terdiri dari 4 taraf (0 ppm; 3 ppm; 6 ppm; 9 ppm) dan 2 taraf lama penyinaran (24 jam dan 0 jam). Analisis menggunakan ANAVA tiga arah dan uji lanjut Duncan. Parameter yang diamati adalah waktu muncul tunas, panjang tunas, jumlah tunas, dan persentase kalus membentuk tunas. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi BA dan lama penyinaran mempengaruhi regenerasi tunas dari kalus kedelai, sedangkan konsentrasi 2,4-D tidak berpengaruh signifikan terhadap regenerasi tunas. Konsentrasi BA yang paling optimal adalah 3 ppm dan lama penyinaran yang optimal adalah kondisi 0 jam. Interaksi konsentrasi BA, 2,4-D dan lama penyinaran berpengaruh terhadap regenerasi tunas terutama pada banyaknya jumlah tunas yang dihasilkan. Perlakuan BA 3 ppm + 2,4-D 6 ppm + 24 jam adalah perlakuan yang optimal dalam meregenerasi tunas dengan jumlah kalus yang banyak. Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk meregenerasi kalus menggunakan ZPT BA dan 2,4-D dan Lama penyinaran.

Abstract

Genetic trait improvement is a way to overcome the low quality soybean. The aim of this research is to determine the effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Benzyl Adenine (BA) concentration and long irradiation and their interaction on bud regeneration from callus soybean, and to determine the interaction of the factors that most optimal in bud regeneration from callus soybean. 2,4-D and BA concentration each consisting of 4 levels (0 ppm; 3 ppm; 6 ppm; 9 ppm) and 2 levels long irradiation (24 hours and 0 hour). Analysis using a three-way ANOVA and Duncan test further. Parameters measured were the time appears bud, bud length, number of buds, and the percentage of callus forming buds. The result showed that BA concentration and long irradiation affects the regeneration of shoots from callus soybean, whereas the concentration of 2,4-D had no significant effect on bud regeneration. The most optimal concentration of BA is 3 ppm and optimal long irradiation is the condition 0 hours. BA concentration, 2,4-D concentration and long irradiation interaction effect on the regeneration of buds mainly on the number of buds produced. Treatment BA 3 ppm + 2,4-D 6 ppm + 24 hours is the optimal treatment in regenerating buds the number of callus that many. Based on the research results suggested to regenerate callus using ZPT BA and 2,4-D and long irradiation.

© 2013 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

FMIPA UNNES Gd D6 Lt 1 Jln. Raya Sekaran- Gunungpati- Semarang 50299
Telp./Fax. (024) 8508033; E-mail: kris_antie@yahoo.com

ISSN 2085-191X

PENDAHULUAN

Glycine max (L.) atau yang lazim dikenal sebagai kedelai merupakan bahan pangan sumber protein nabati bagi manusia, banyak diperlukan dalam berbagai industri, serta pakan ternak. Sampai saat ini, kedelai bisa dikatakan masih menjadi salah satu komoditas pangan yang sangat penting di Indonesia. Permintaan akan komoditas ini terus meningkat dari tahun ke tahun, sedangkan kedelai yang dibudidayakan di Indonesia terdiri dua spesies: *Glycine max* (disebut kedelai putih, yang bijinya bisa berwarna kuning, agak putih, atau hijau) dan *Glycine soja* (kedelai hitam, berbiji hitam). Kedelai putih juga sering disebut dengan kedelai lokal, seperti Anjasmoro, Panderman, Argomulyo, Bromo, Burangrang, Kawi, Tampomas, Krakatau, Wilis, Grobogan, dan kedelai impor terdiri dari Cikuray, Merapi, Mallika, dan Kawi.

Kedelai Grobogan, mempunyai daya ketahanan yang tinggi terhadap kekeringan dan mempunyai biji lebih besar daripada jenis kedelai yang lain. Variasi somaklonal dari kedelai ini menunjukkan akumulasi prolin lebih tinggi dibandingkan dengan varian somaklonal kedelai biasa, namun demikian kandungan gula total pada varian somaklonal dari kedelai grobogan maupun yang biasa tidak menunjukkan perbedaan (Sap-towo 2008).

Kendala utama peningkatan produksi kedelai itu antara lain kualitas rendah dan tidak tahan terhadap serangan hama (Adisarwanto dan Wudianto 2002). Salah satu alternatif untuk mengatasi kualitas kedelai yang rendah yaitu dengan adanya perbaikan sifat melalui variasi somaklonal dan transformasi genetik, dengan menggunakan kalus kedelai, yang mana kalus dapat diregenerasikan menjadi tunas. Sampai saat ini belum diketahui metode yang optimal untuk meregenerasikan kalus menjadi tunas, oleh sebab itu saat ini peneliti akan menerapkan metode regenerasi kalus menjadi tunas melalui tahapan *in vitro*. Penerapan metode kultur *in vitro* merupakan langkah awal untuk mendapatkan perbaikan kualitas tanaman.

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan zat pengatur tumbuh (ZPT) (Yusnita 2003). Bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal kultur *in vitro* disebut sebagai eksplan (Yuwono 2008). Eksplan akan berkembang menjadi tanaman yang lengkap jika dikulturkan pada

media yang sesuai. Pola perkembangannya dapat terjadi secara langsung (tidak melalui pembentukan kalus) maupun tidak langsung (melalui pembentukan kalus). Menurut Yuwono (2008) kalus dapat disubkultur dengan cara mengambil sebagian kalus dan memindahkannya pada media kultur baru. Melalui sistem induksi yang tepat kalus dapat berkembang menjadi tanaman yang utuh sehingga penyediaan bibit tanaman melalui perbanyakan kalus sangat menguntungkan. Keuntungan utama dari teknik kultur jaringan adalah untuk mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat, yang mempunyai sifat fisiologi dan morfologi sama persis dengan tanaman induknya (Hendaryono & Wijayani 1994).

Salah satu faktor yang mempengaruhi berhasil tidaknya pengadaan kedelai melalui kultur jaringan adalah adanya zat pengatur tumbuh (ZPT) dan lama penyinaran. Namun, kandungan hormon pada tanaman juga harus diperhatikan. Hormon pada tanaman disebut juga fitohormon. Menurut (Pierik 2002) fitohormon adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa tersebut berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. Penanaman eksplan dalam media dengan penambahan 2,4-D menyebabkan pada kalus akan terbentuk tunas dan akar. Tetapi, 2,4-D ini mempunyai kelemahan juga, sebab tanaman yang dibudidayakan dapat mengalami mutasi sehingga terjadi banyak variasi genetik. Untuk tujuan cloning hal ini tentu saja merugikan, tetapi apabila tujuannya untuk mendapatkan variabel pada tanaman umur pendek, maka penambahan dengan 2,4-D dosis tinggi dapat ditempuh (Hendaryono dan Wijayani 1994).

Kedelai dapat diregenerasikan melalui dua proses yang berbeda, yaitu organogenesis (melalui pembentukan organ langsung dari eksplan) dan embriogenesis somatik (melalui pembentukan embrio somatik) (Barwale *et al.* 1998). Dibandingkan dengan embriogenesis, organogenesis mempunyai keunggulan, yaitu peluang terjadinya mutasi lebih kecil.

Tunas dapat dikatakan tumbuh jika terlihat adanya tonjolan-tonjolan (± 2 mm) berwarna hijau pada kalus yang telah terbentuk. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa terbentuknya tunas adventif dipengaruhi oleh adanya interaksi antara auksin dan sitokinin. Tunas yang terbentuk berasal dari hasil pemanjangan tunas pucuk batang tanaman dan tunas yang berasal dari diferensiasi jaringan kalus pada eksplan.

Teknik perbanyakkan tanaman secara *in vitro*, umumnya diinkubasikan pada ruang penyimpanan dengan penyinaran kecuali pada teknik perbanyakkan yang diawali dengan pertumbuhan kalus (Mulyaningsih & Aluh 2008). Induksi kalus dari eksplan daun pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) yang dilakukan oleh Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT) Serpong, Tangerang, optimal dilakukan di ruang gelap selama 2 bulan begitu juga induksi kalus dari anter karet (*Hevea brasiliensis*) (Jayasree 2009). Penelitian terhadap pertumbuhan kalus dan pembentukan senyawa alkaloid *kinolina* pada *Cinchona ledgeriana* dipengaruhi oleh umur kalus dan ada tidaknya cahaya (Grace 2005). Induksi kalus pada anter anggur optimal pada fotoperiode 16 jam terang dan 8 jam gelap dan gelap total (Tangolar *et al.* 2008).

Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui konsentrasi 2,4-D dan BA serta lama penyinaran yang optimal untuk dapat meregenerasi tunas dari kalus kedelai Grobogan. Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D dan BA serta lama penyinaran terhadap regenerasi tunas dari kalus kedelai, untuk mengetahui pengaruh interaksi konsentrasi 2,4-D dan BA serta lama penyinaran terhadap regenerasi tunas dari kalus kedelai, dan untuk menentukan interaksi faktor-faktor yang paling optimal dalam regenerasi tunas dari kalus kedelai.

METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Penelitian ini dilaksanakan selama \pm 6 bulan yaitu pada bulan November 2010-Mei 2011.

Bahan dalam penelitian ini adalah kalus yang berasal dari biji kedelai varietas Grobogan yang diperoleh dari Balai Penelitian Kacangkacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi-Malang) yang ditumbuhkan pada medium MS, 2,4-D+BA. Penelitian ini terdiri atas 3 perlakuan yaitu konsentrasi 2,4-D, konsentrasi BA, dan lama penyinaran. Konsentrasi 2,4-D terdiri atas 4 taraf uji yaitu 0 ppm; 3ppm; 6ppm; 9ppm, konsentrasi BA terdiri atas 4 taraf uji yaitu 0 ppm; 3ppm; 6ppm; 9ppm, dan lama penyinaran terdiri atas 2 taraf uji yaitu 24 jam dan 0 jam. Penelitian dilakukan dengan 3 kali perulangan sehingga diperlukan $4 \times 4 \times 2 \times 3 = 96$ unit perlakuan. Satu unit perlakuan berupa 1 botol kultur yang ditanam 3 potongan kalus berukuran 0,5 cm.

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak kelompok, dengan pembagian kelompok berdasarkan pada lama penyinaran, konsentrasi BA, dan konsentrasi 2,4-D. Dasar menentukan konsentrasi asam 2,4-D dan BA diatas karena 2,4-D & BA yang sering digunakan dalam regenerasi kalus dari konsentrasi 0-10 ppm. Menurut Collin dan Edward (1998) konsentrasi auksin dan sitokinin seimbang menghasilkan regenerasi tunas secara optimal.

Prosedur penelitian dimulai dengan langkah sterilisasi alat dan bahan. Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat dari gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian didek-ringanginkan. Kemudian alat-alat *dissecting set* (pinset, gunting, scalpel) disterilisasi dengan alkohol 96% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF. Alat-alat gelas ditutup aluminium foil, sedangkan alat-alat logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas payung, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Sedangkan media dalam setiap botol kultur disterilisasi dengan cara yang sama pada autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

Prosedur penelitian dilanjutkan dengan pembuatan media Kultur Murashige-Skoog, 2,4-D, dan BA. Pembuatan media MS (Murashige-Skoog) dilakukan dengan pembuatan larutan stok terlebih dahulu. Untuk membuat 1 liter media kultur, diambil satu demi satu larutan stok hara makro sebanyak 100 ml, larutan stok Ca sebanyak 10 ml, larutan stok hara mikro A sebanyak 10 ml, larutan stok hara mikro B sebanyak 1 ml, larutan besi (Fe) sebanyak 10 ml, larutan stok vitamin sebanyak 1 ml, larutan stok myo-inositol sebanyak 20 ml. Kemudian dimasukkan sukrosa 30 g (tidak dibuat stok). Selanjutnya ditambahkan larutan stok asam 2,4-D dan BA sesuai perlakuan. Lalu ditambahkan aquades hingga volume mencapai 1 liter.

Lalu setelah itu dilakukan inkubasi. Botol-botol yang berisi kalus torpedo diletakkan di atas rak kultur secara acak sesuai rancangan percobaan, di dalam ruang inkubasi yang bersuhu 24°C. Perlakuan terang 24 jam diberikan dengan meletakkan botol kultur pada rak yang diterangi lampu TL 1000 lux atau setara dengan 40 watt. Untuk Perlakuan gelap 24 jam diberikan dengan meletakkan botol kultur pada rak yang ditutup dengan plastik gelap tanpa penerangan.

Regenerasi kalus dapat dilakukan melalui induksi tunas (organogenesis) atau induksi embrio somatik (embriogenesis somatik). Kalus hasil induksi dipindahkan pada media perlakuan

2,4-D+BA dengan konsentrasi 0 ppm, 3 ppm, 6 ppm, dan 9 ppm. Kalus dipelihara pada kondisi terang dengan cahaya flouresen dan kondisi gelap tanpa cahaya pada suhu 25-26°C. kemudian diamati perkembangan kalus selama 8 minggu.

Pengambilan data dilakukan dengan menghitung waktu muncul tunas jarak waktu antara kalus menjadi tunas (hari), jumlah tunas, panjang tunas yang diikuti dengan adanya tonjolan-tonjolan (± 2 cm) berwarna hijau pada kalus yang telah terbentuk, dan persentase kalus yang membentuk tunas pada berbagai konsentrasi 2,4-D+BA.

Data hasil pengamatan dianalisis uji ANAVA tiga faktorial dengan suatu program paket statistika SAS untuk melihat pengaruh perlakuan. Apabila suatu perlakuan berpengaruh, dilanjutkan pengujian dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 95% (Gomez dan Gomez, 1995) untuk menentukan perbedaan pengaruh antara taraf-taraf perlakuan dan interaksinya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap regenerasi dari kalus kedelai ditumbuhkan dalam médium BA, 2,4-D dan lama penyinarana. Tahap regenerasi digunakan untuk

mengetahui pengaruh waktu muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, dan persentase kalus membentuk tunas. Respon tunas *Glycine max* (L.) Merill terhadap penambahan 2,4-D, BA dan lama penyinaran dalam pengamatan waktu muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, dan persentase kalus membentuk tunas dengan berbagai kombinasi taraf perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Kombinasi perlakuan C1B1D1, C1B3D1, C1B3D3, C1B4D3, C1B4D4, C2B1D1, C2B1D4, C2B2D4, C2B4D1, C2B4D2, C2B4D4, tidak mampu melakukan regenerasi. Hal ini disebabkan karena pada kombinasi perlakuan tersebut kalus mati, sehingga pertumbuhan menjadi tunas terhenti. Pada Tabel 3 terlihat bahwa tunas mulai tumbuh pada hari ke 19 sampai hari ke 35. Adanya perbedaan waktu tumbuh tunas ini disebabkan karena masing-masing kombinasi perlakuan memberikan respon pada kalus yang berbeda dari tiap kalus yang akan diregenerasikan.

Berdasarkan hasil anava tiga faktorial Tabel 2 diketahui bahwa untuk pengamatan konsentrasi BA, konsentrasi 2,4-D, interaksi antara konsentrasi BA x 2,4-D, interaksi antara konsentrasi BA x lama penyinaran menunjukkan hasil yang signifikan. Sedangkan lama penyinaran, interaksi antara konsentrasi 2,4-D dan lama pe-

Tabel 1. Respon tunas *Glycine max* (L.) Merill terhadap penambahan konsentrasi 2,4-D, BA dan lama penyinaran dalam pengamatan waktu muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, dan persentase kalus membentuk tunas

Perlakuan	Waktu muncul tunas (hari)	Jumlah Tunas	Panjang tunas	Persentase kalus Membentuk tunas
C2B2D1	19,5	2	1,7	10
C1B3D2	20	1	0,8	10
C1B4D2	20	2	1,8	10
C1B2D1	21,33	3,33	2,2	15
C1B2D2	21,33	3,33	1,66	23,33
C1B2D3	21,33	3,33	2,4	25
C1B2D4	21,33	3	2	11,66
C2B3D2	22,33	2,66	1,06	11,66
C1B1D2	22,33	1	2,4	10
C1B1D3	23	1,33	1,6	5
C2B2D3	24	1	1,8	12,5
C2B1D3	24	1,5	1,6	12,5
C2B1D2	24,33	1,66	2,4	5
C2B4D3	28	2	1,6	10
C1B3D4	28	2	1,9	12,5
C2B2D2	28,5	2,5	1,6	12,5
C1B1D4	28,5	1,5	1,8	10
C1B4D1	29	2	1,6	10
C2B3D1	30	2	1,93	11,66
C2B3D3	31	1,33	2	15
C2B3D4	32,67	1,33	1,73	11,6
	35,33	1,66		

Tabel 2. Analisis pengaruh konsentrasi BA, 2,4-D, dan lama penyinaran terhadap persentase kalus membentuk tunas

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F		
				Hitung	5%	1%
Ulangan	= 2	14,58	7,29			
(BA)	= 3	1827,08	609,02	57,61**	5,14	10,92
Galat (BA)	= 6	63,42	10,57			
(2,4-D)	=3	154,16	51,38	22,24**	3,16	5,09
BA X 2,4-D	=9	360,42	40,04	17,33**	2,46	3,60
Galat (2,4-D)	=24	55,67	2,31			
Lama Penyinaran	=1	26,03	26,03	0,82 ^{tn}	4,15	7,50
BA X Lama Penyinaran	=3	1596,89	532,29	16,79**	2,90	4,46
2,4-D X Lama Penyinaran	=3	86,47	28,82	0,90 ^{tn}	2,90	4,46
BA X 2,4-D X Lama Penyinaran	=9	223,95	24,88	0,78 ^{tn}	2,19	3,01
Galat (Lama Penyinaran)	=32	1014,63	31,70			
Umum	=95	5433,3				

Keterangan : * signifikan; **sangat signifikan; ^{tn} tidak signifikan

nyinaran, interaksi antara konsentrasi BA x 2,4-D, dan pencahayaan dari masing-masing data menunjukkan hasil yang berbeda signifikan. Pada hasil anava tiga faktorial terhadap jumlah tunas yang menunjukkan hasil yang signifikan tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji duncan.

Uji Duncan ini dilakukan hanya apabila hasil analisis ragam berpengaruh signifikan. Hasil yang berpengaruh signifikan adalah Konsentrasi BA, konsentrasi 2,4-D, lama penyinaran, interaksi BA dan 2,4-D, interaksi lama penyinaran dan konsentrasi BA, interaksi lama penyinaran dan konsentrasi 2,4-D, serta interaksi ketiga faktor (Ba x 2,4-D x lama penyinaran).

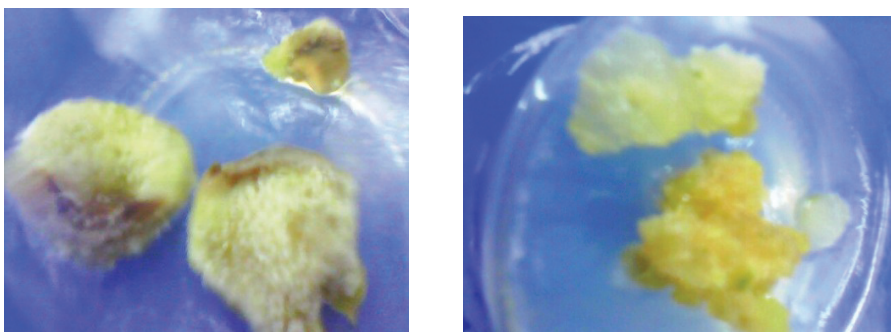
Hasil sidik ragam ketiga parameter faktor A (konsentrasi BA) berpengaruh terhadap waktu muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, dan persentase kalus membentuk tunas. Pada Uji Duncan akan ditemui huruf yang ada di belakang nilai rata-rata. Penambahan huruf "a", "b" dan seterusnya mulai dari nilai rata-rata terkecil. Perlakuan yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda signifikan pengaruhnya menurut

DMRT 5%.

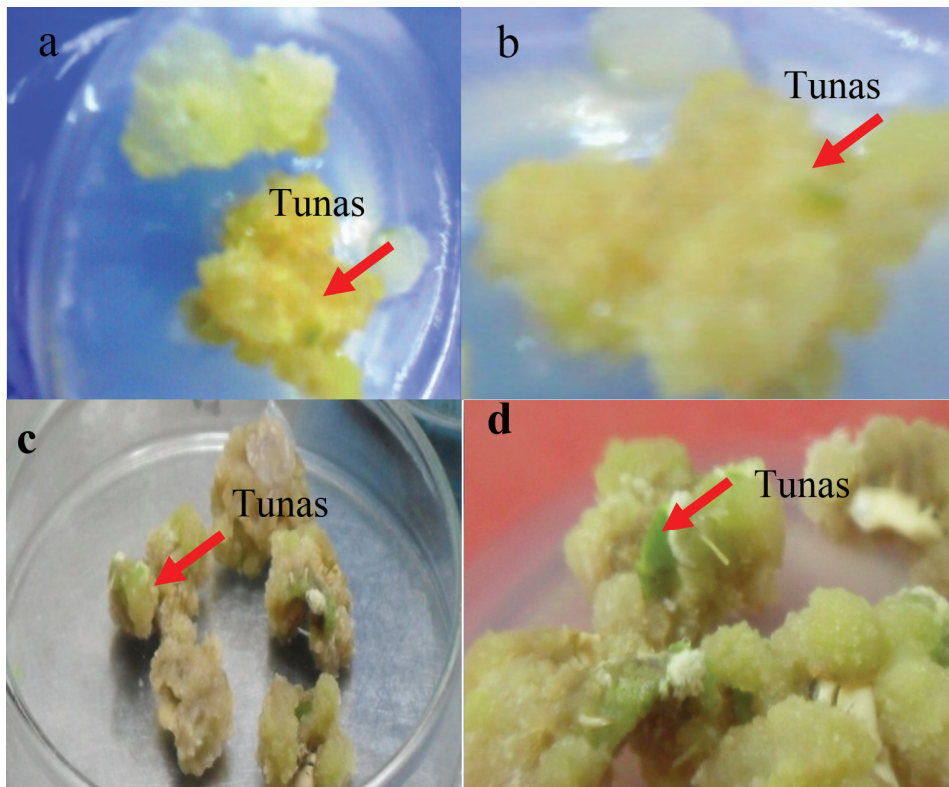
Penelitian ini menggunakan kalus yang mempunyai tekstur yang remah dan berukuran relatif kecil.

Beberapa organ yang terbentuk selama masa inkubasi di beberapa perlakuan regenerasi tunas dari kalus kedelai. Pada Gambar 2 terlihat adanya perbedaan tanda-tanda hasil regenerasi dari tiap-tiap perlakuan.

Regenerasi tunas yang berasal dari kalus kedelai membuktikan bahwa tidak semua kalus mampu melakukan regenerasi pada tiap-tiap perlakuan. Hal ini diduga karena diperlukan waktu yang lebih lama lagi untuk proses pembentukan tunas. Wiendi *et all* (1991) menyatakan bahwa pada beberapa tanaman membutuhkan waktu yang lama untuk beregenerasi, karena penggunaan sitokinin endogen tidak mencukupi untuk pembentukan tunas berarti selain auksin zat pengatur tumbuh sitokinin juga perlu ditambahkan ke dalam media. Pierik (2002) menyatakan bahwa sitokinin berperan dalam memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman khususnya tunas



Gambar 1. bentuk kalus (a) kalus kompak, (b) kalus remah



Gambar 2. a perlakuan BA 6 ppm + 2,4-D 3 ppm pada kondisi terang, b perlakuan BA 9 ppm + 2,4-D 6 ppm pada kondisi gelap, c perlakuan BA 3 ppm + 2,4-D 3 ppm pada kondisi terang, d perlakuan BA 6 ppm + 2,4-D 6 ppm pada kondisi gelap

adventif. Tanpa adanya penambahan sitokinin ke dalam media tanam menyebabkan kalus tidak mampu berorganogenesis membentuk tunas karena tidak adanya interaksi antara auksin dan sitokinin endogen dengan auksin dan sitokinin eksogen. Sesuai pendapat Gunawan (1995) bahwa penambahan auksin dan sitokinin eksogen akan merubah level zat pengatur tumbuh endogen sel. Pembentukan tunas secara *in vitro* baik melalui morfogenesis langsung dan tak langsung sangat tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, inorganik dan zat pengatur tumbuh (Wiendi *et all* 1991).

BA berpengaruh dalam meregenerasi tunas dari kalus kedelai. Respon yang optimal dicapai pada konsentrasi 3 ppm. Pemunculan tunas hasil regenerasi yang lambat terjadi pada konsentrasi 9 ppm yakni 27,29 hari, diduga karena adanya konsentrasi BA yang digunakan kurang sesuai, yang akhirnya bersifat sebagai penghambat pertumbuhan (Sudarmadji 2003). Menurut Wattimena (1992) efek penghambatan pembelahan sel oleh BA tergantung dari adanya ZPT yang lain terutama jenis auksin.

Lama penyinaran juga berpengaruh terhadap regenerasi tunas dari kalus kedelai, pada pengamatan terhadap waktu muncul tunas tercepat

terjadi pada pengaruh lama penyinaran selama 24 jam. Pada lama penyinaran selama 24 jam tersebut akan meregenerasi kalus ke arah diferensiasi, hal ini cahaya mengaktifkan proplastida menjadi kloroplas dan terbentuknya tilakoid pada kloroplas dan menginduksi sel untuk membentuk klorofil, sehingga proses fotosintesis terjadi dan pertumbuhan tunas yang tidak maksimal. Lama penyinaran 0 jam atau gelap total bertujuan agar tidak terjadi fotosintesis (Lestari dan Mariska 2002), sehingga nilai tertinggi eksplan membentuk kalus lebih banyak. Lama penyinaran 24 jam ini dikatakan dapat meregenerasi tunas tercepat, namun hal ini tidak berarti jika tunas yang dihasilkan sedikit (persentasenya rendah). Kondisi terang selama 24 jam menghasilkan tunas yang sama dengan tunas dari kondisi gelap, namun pada penyinaran yang terus menerus kalus akan berwarna hijau. Selain intensitas cahaya, lama penyinaran (fotoperiodisme) mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang dikulturkan (Mulyaning-sih dan Aluh 2008).

Interaksi antara konsentrasi BA, 2,4-D, dan kondisi cahaya mempengaruhi jumlah tunas yang terbentuk. Interaksi konsentrasi BA 3 ppm + 2,4-D 0 ppm + terang, merupakan interaksi yang optimal karena menghasilkan tunas sebanyak

ak 3,33 buah. Lama penyinaran selama 24 jam secara tidak langsung merupakan salah faktor yang dibutuhkan untuk pembelahan sel yang selanjutnya membentuk kalus.

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BA memegang peranan penting dalam kultur jaringan. Hal ini dikarenakan penambahan 2,4-D dan BA secara eksogen kedalam media diduga meregenerasi sel-sel potongan jaringan sehingga aktivitas enzim dan metabolisme jaringan dapat bekerja dengan aktif. BA dalam penelitian ini berperan antara lain dalam pembelahan sel dan morfogenesis sedangkan 2,4-D mampu mengatur berbagai proses pertumbuhan dan pemanjangan sel. Regenerasi tunas selain dipengaruhi oleh kedua ZPT yaitu BA dan 2,4-D, juga dipengaruhi oleh adanya perbedaan kondisi cahaya. Terlihat pada Tabel 3 bahwa proses regenerasi tunas yang berasal dari kalus membutuhkan pasokan 2,4-D eksogen yang cukup tinggi (3-9 ppm) karena diduga kandungan auksin endogen dalam tanaman rendah. Walaupun pemberian auksin eksogen cukup tinggi dan penambahan BA 6 ppm regenerasi tunas terjadi jika diinkubasi di lama penyinaran 24 jam.

Umumnya regenerasi tunas terjadi hampir di semua perlakuan ZPT yaitu pada kisaran konsentrasi BA 3-6 ppm dan 2,4-D pada konsentrasi 3-6 ppm. Konsentrasi 2,4-D yang lebih rendah dari pada BA hanya dapat melakukan regenerasi tunas, karena dengan konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dari BA hanya dapat menginduksi kalus. Hal ini dimungkinkan karena media tidak sesuai disebabkan keseimbangan zat pengatur tumbuh yang ada di dalam sel dan di luar sel baik antara auksin dan sitokinin tidak seimbang (Thorpe 1994).

Dari beberapa tunas yang tumbuh ada yang mengalami *browning* (pencoklatan). Hal ini disebabkan karena sel terluka dan setiap jaringan memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk memulai proses pembentukan tunas. Kematian sel di permukaan eksplan menghambat kecepatan jaringan menyerap nutrisi dan eksplan ini tidak bisa bertahan dengan metode *in vitro*.

Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau kuning menjadi putih kekuningan dan selanjutnya menjadi kehijauan seperti pada lampiran 7. Perubahan warna tersebut merupakan tanda adanya morfogenesis (George 1993). Tetapi pertumbuhannya berhenti setelah membentuk daun. Kalus tersebut harus dipindahkan ke media organogenesis dengan perbandingan ZPT yang tepat agar dapat membentuk organ lainnya sehingga

menjadi *planlet*. Dalam penelitian ini sel-sel kalus dapat berkembang membentuk embrio somatik, tetapi tidak semua sel-sel kalus tersebut mampu berkembang menjadi embrio somatik. Hal ini disebabkan karena adanya kompetisi antar sel-sel embriogenik untuk mengadakan perkembangan lebih lanjut.

Pemberian BA eksogen juga diperlukan untuk mendorong organogenesis eksplan untuk membentuk planlet karena BA endogen tidak mencukupi untuk pembentukan planlet. Interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh endogen dengan zat pengatur tumbuh eksogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur. Hasil penelitian Chatri (2001) terhadap meristem pucuk kedelai dengan penambahan NAA 1 μ M dapat membentuk planlet. Hal ini terjadi karena meristem pucuk kedelai tersebut mengandung sitokinin yang cukup untuk pembentukan tunas.

SIMPULAN

Berdasarkan uraian pembahasan dan hasil uji statistik, dapat ditarik simpulan bahwa konsentrasi BA dan lama penyinaran merupakan faktor yang mempengaruhi regenerasi tunas dari kalus kedelai, interaksi konsentrasi BA dan lama penyinaran, interaksi konsentrasi 2,4-D dan lama penyinaran mempengaruhi regenerasi tunas dari kalus kedelai, dan interaksi yang paling optimal untuk meregenerasi tunas dari kalus kedelai terhadap pengamatan jumlah tunas paling banyak adalah konsentrasi BA 3 ppm + 2,4-D 0 ppm + lama penyinaran selama 24 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Chatri M. (2001). Pengaruh Pemberian NAA dan BAP Terhadap Meristem Pucuk Kedelai pada Medium B5. *J Stigma* 11(1): 10-13.
- Collin HA. & S. Edward. (1998). *Plant Cell Culture*. UK: BIOS Scientific Publisher. Pp. 103-1121.
- Gomez KA dan AA Gomez. (1995). *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. Edisi kedua. Jakarta: UI-PRESS.
- Gunawan LW. (1995). *Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hendaryono DPS & A Wijayani. (1994). *Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Jayasree K, Asokan MP, Sobha S, L. Sankari, Ammal KR, Kala RG, Jayasree R dan Thulaseedharan A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg. *x P On line at <http://rubberresearch.or.id/insitute-of-india>*. [diakses tanggal 9 Maret

- 2009].
- Mariska I. (2007). Perkembangan Penelitian Kultur In Vitro pada Tanaman Industri, Pangan, dan Hortikultura. *Buletin AgroBio* 5 (2): 45-50.
- Mulyaningsih T dan Aluh N. (2008). Faktor-faktor Yang Berpengaruh Pada Keberhasilan. Mikropropagasi. *On line at [http://elearning.Unram.ac.id/KulJar/BAB%20VI20 Mikropropagasi/VI4Contoh20Teknik%20Perbanyakan%20Tanaman%20Hortikultura.htm](http://elearning.Unram.ac.id/KulJar/BAB%20VI20%20Mikropropagasi/VI4Contoh20Teknik%20Perbanyakan%20Tanaman%20Hortikultura.htm)*. [diakses tanggal 20 oktober 2008].
- Pierik, R. L. M., (2002). *In Vitro Culture of Hinger Plant*. Martinus Nijhoff Publisher. Netherlands.
- Sudarmadji. (2003). Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas secara *In Vitro*. *Buletin Teknik Pertanian* 8(1):8-1
- Wattimena GA. (1992). *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU IPB.
- Wiendi NMA, GA Wattimena, LW Gunawan. (1991). *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB.
- Yusnita. (2003). *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yuwono T. (2008). *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.