

**Potensi Terbentuknya Kalus Embriogenik pada Beberapa Varietas Kedelai**  
(*Glycine max*(L.) Merrill) Toleran terhadap Kondisi Hipoksia secara *In Vitro*

*The Potential Formation Of Embryogenic Callus Of The Hypoxia Condition  
Tolerant Of Soybean Varieties In Vitro*

**Sopa Putri Tanjung\*, Revandy I.M. Damanik dan Luthfi Aziz Mahmud Siregar**

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian USU, Medan, 20155.

\*Corresponding author: souvaprincess@gmail.com

**ABSTRACT**

The aims of the research was to determine the growth response and to identify the potential embryogenic callus of the hypoxia condition tolerant of soybean varieties in vitro. The research was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory and the Laboratory of Food Technology, Faculty of Agriculture, North Sumatera University, Medan, Indonesia, from March 2016 to September 2016. The result were analyzed with t-test with the combination between soybean varieties (Baluran, Gepak kuning, Willis) and the plant growth regulators (2,4-D, NAA, IAA) 10 mg/l. The parameters observed were: the percentage of plants forming callus, the callus colour, the callus texture, the callus histological, the fresh weight of callus, the total chlorophyll content, the protein concentration, the SOD activity and the POD activity. The result showed that the combination between varieties Gepak Kuning and Willis with 10 mg/l 2,4-D significantly affected the growth of embryogenic callus, the fresh weight of callus, the total chlorophyll content, the protein concentration, the SOD and POD activities.

Keywords : 2,4-D, Hypoxia, IAA, Identification of Soybean Embryogenic Callus, NAA, Plant Growth Regulators, POD, SOD.

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan dan identifikasi kalus embriogenik potensial pada beberapa varietas kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) toleran terhadap kondisi hipoksia secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia, dari Maret 2016 sampai September 2016. Data dianalisis dengan Uji t menggunakan kombinasi perlakuan, yaitu kombinasi antara varietas kedelai (Baluran, Gepak Kuning, Willis) dan media dengan zat pengatur tumbuh (2,4-D, NAA, IAA) 10 mg/l. Parameter yang diamati: persentase eksplan membentuk kalus, warna kalus, tekstur kalus, histologikalus, bobot segar kalus total, kandungan klorofil total, konsentrasi protein, aktivitas SOD dan aktivitas POD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi varietas Gepak Kuning dan Wilis dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D 10 mg/l secara signifikan mempengaruhi pertumbuhan kalus embriogenik, bobot segar kalus total, kandungan klorofil total, konsentrasi protein, aktivitas enzim SOD dan POD.

**Kata kunci :** 2,4 D, Hipoksia, IAA, Identifikasi Kalus Embriogenik Kedelai, NAA, POD, SOD, Zat Pengatur Tumbuh

**PENDAHULUAN**

Tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan salah satu tanaman

pangan yang sudah lama dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia. Tanaman ini mempunyai arti penting untuk memenuhi kebutuhan pangan dalam rangka perbaikan

gizi masyarakat, karena merupakan sumber protein nabati yang relatif murah bila dibandingkan sumber protein lainnya seperti daging, susu, dan ikan. Di samping itu kedelai juga mengandung mineral seperti kalsium, posfor, besi, vitamin A dan B (Mapegau, 2006).

Kedelai merupakan sumber protein nabati yang sangat dibutuhkan oleh masyarakat Indonesia, sehingga dengan meningkatnya jumlah penduduk dan kesadaran akan kebutuhan protein berdampak pada kebutuhan akan kedelai terus meningkat dari tahun ke tahun. Rata-rata kebutuhan kedelai setiap tahunnya sebesar  $\pm 2,2$  juta ton biji kering, akan tetapi kemampuan produksi dalam negeri saat ini baru mampu memenuhi sebanyak 779.992 ton (BPS, 2013) atau 33,91% dari kebutuhan sedangkan berdasarkan ARAM II tahun 2014 baru mencapai 921.336 ton atau 40,06% (Kementerian Pertanian, 2015).

Selain itu, pemanasan global yang menyebabkan peningkatan curah hujan dan kenaikan permukaan laut dapat mengakibatkan banyak lahan pertanian yang tergenang. Tersedianya varietas kedelai yang adaptif pada kondisi tersebut akan memberikan arti penting dalam rangka percepatan peningkatan produksi kedelai di dalam negeri. Peluang perakitan varietas kedelai toleran genangan sangat terbuka dengan tersedianya sumber-sumber gen dan metode skrining yang sederhana, mudah, dan cepat. Kerja sama dengan lembaga internasional terutama dalam pertukaran sumber gen akan mempercepat program pemuliaan kedelai toleran genangan di Indonesia (Hapsari dan Adie, 2010). Suriadikarta dan Sutria, (2007) juga menyatakan bahwa pengembangan kedelai toleran genangan tidak hanya bermanfaat bagi pengembangan kedelai di lahan sawah, tetapi juga prospektif bagi wilayah yang sering mengalami cekaman genangan seperti lahan pasang surut. Luas lahan pasang surut di Indonesia mencapai 20,10 juta ha, sekitar 20–30% di antaranya berpotensi sebagai lahan pertanian

Genangan berpengaruh terhadap proses metabolisme pada tanaman yaitu akan terjadi gangguan pada proses fisiologis dan biokimiawi yaitu respirasi, permeabilitas akar, penyerapan air dan hara, penyematan N. Genangan menyebabkan kematian akar di kedalaman tertentu dan hal ini akan memacu pembentukan akar adventif pada bagian di dekat permukaan tanah pada tanaman yang tahan genangan. Kematian akar menjadi penyebab kekahatan N dan cekaman kekeringan fisiologis. Kondisi jenuh air tadi akan menghambat perkembangan dan pertumbuhan tanaman (Harjanti, 2012).

Varietas unggul berasal dari varietas lokal, varietas liar, varietas introduksi, galur homozigot, mutan atau genus-genus yang sama, yang mempunyai potensi hasil tinggi dan sesuai dengan target pemuliaan yang diinginkan. Varietas tersebut dinyatakan sebagai varietas unggul, apabila telah melalui kegiatan seleksi dan uji daya hasil (Suhartina, 2005). Untuk itu perlunya dilakukan pemilihan terhadap varietas-varietas kedelai yang memiliki daerah sebaran dan adaptasi yang baik pada kondisi tergenang seperti di lahan sawah dan tegal diantaranya adalah varietas Gepak kuning, Wilis dan Baluran untuk mendapatkan varietas baru yang dapat diuji di lapangan.

Salah satu alternatif untuk mengatasi kendala diatas adalah dengan melakukan perbanyakan tanaman secara vegetatif melalui teknik kultur *invitro*, sebagai contoh kultur kalus (Fauziyyah *et al.*, 2012). Gunawan (1987), mengatakan salah satu tujuan teknik *in vitro* adalah membantu dalam seleksi dan pemuliaan tanaman dalam pengembangan varietas-varietas baru yang toleran terhadap stres lingkungan. Metode kultur jaringan yang pada mulanya hanya suatu penelitian fisiologis, dewasa ini menduduki posisi yang penting dalam perkembangan pertanian.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan dan identifikasi kalus embriogenik potensial pada beberapa varietas kedelai toleran terhadap kondisi hipoksia secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian tempat  $\pm 25$  m dpl pada bulan Maret 2016 sampai dengan September 2016.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan eksplan: biji kedelai yang diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi) Malang meliputi benih kedelai varietas Baluran, Gepak kuning dan Wilis, berupa kotiledon yang telah dipisahkan dari bagian embrio. Bahan kimia medium MS: larutan stok makronutrien; larutan stok mikronutrien, sukrosa, vitamin, asam amino, larutan stok zat pengatur tumbuh 2,4-D, NAA dan IAA, akuades steril; agar; bahan sterilisasi yaitu alkohol 70%, spiritus, deterjen, *Dithane*, *Benlate*, *Chlorox* dan *Iodine*. Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCL 0,1 N. kertas label, kertas saring, kertas payung, kertas tisu, korek, *aluminium foil*; bahan larutan analisa histologi kalus yaitu *Acetocarmin* 2%, alkohol 96% dan Asam asetat; bahan larutan analisa klorofil yaitu aseton 85%, kertas saring; bahan larutan analisa protein yaitu  $H_2SO_4$  pekatkatalis ( $CuSO_4:K_2SO_4$  dengan perbandingan 1:1), akuades, NaOH 40%, metil merah 0.02%, metil biru 0.02% dan alkohol; bahan larutan analisa Enzim SOD yaitu PVPP, nitrogen cair, buffer ekstrak, buffer *potassium phosphate*, EDTA, *L-Methionin*, NBT, dan riboflavin; bahan larutan analisa Enzim POD yaitu PVPP, nitrogen cair, CaCl, fenol, *Amino antipirine*, dan buffer MES pH 6..

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas: gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (*scalpel*, pinset, gunting), *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), timbangan analitik, pipet tetes, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, termometer, lampu *fluorescent*, *hot plate*,

*magnetic stirrer*, mortar, alu, mikroskop cahaya, mikropipet, *tube*, tips(biru, kuning), *sentrifuse*, *vortex*, *cuvet*, spektrofotometer UV-Vis, *waterbath*, oven, labu kjedhal, alat destilasi, kondensor dan kamera.

Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu: (1) Tahap pembentukan kalus embriogenik; (2) Tahap identifikasi kalus toleran genangan, dimana pada tahap identifikasi ini adanya perbandingan antarakalus saat sebelum dan setelah penggenangan. Pada tahap pertama, penelitian dilakukan untuk pembentukan kalus embriogenik dengan kombinasi perlakuan yang diuji, yaitu kombinasi antara beberapa varietas dan beberapa media dengan Zat Pengatur Tumbuh yang diuji. Adapun varietas yang diuji terdiri dari 3 taraf, yaitu: V1 : Baluran, V2 : Gepak kuning, V3 : Wilis. Dan media dengan ZPT yang diuji terdiri dari 3 taraf, yaitu: A1 : MS + 2,4-D 10 mg/l, A2 : MS + NAA 10 mg/l, A3 : MS + IAA 10 mg/l.

Jumlah ulangan sebanyak 3 ulangan dengan jumlah perlakuan yaitu 9 kombinasi. Jumlah varietas yaitu 3 varietas dimana jumlah eksplan tiap tabung uji adalah 1 tanaman dengan jumlah seluruh eksplan sebanyak 27 eksplan dan jumlah seluruh botol yaitu 27 botol kultur dimana jumlah sampel/botol yaitu 1 sampel.

Biji kedelai sebagai sumber eksplan direndam selama 50 menit. Lalu direndam 30 menit dengan deterjen sambil digojok, setelah itu dibilas dengan air mengalir sebanyak 3 kali. Pekerjaan selanjutnya dilakukan di LAFC yang sudah disterilkan dengan alkohol 70%. Eksplan yang sudah bersih direndam dalam larutan fungisida *Dithane* M-45 2 g/l, kemudian digojok selama 30 menit, kemudian dibilas dengan *aquades* steril minimal 3 kali. Lalu direndam kembali dalam larutan *Benlate* kemudian digojok selama 30 menit. selanjutnya dibilas dengan *aquades* steril minimal sebanyak 3 kali. Setelah itu eksplan direndam dalam larutan *Chlorox* 10% selama 15 menit sambil digojok, kemudian dibilas dengan *aquades* steril minimal 3 kali. Eksplan direndam dengan larutan *Iodine* selama 10 menit sambil digojok kemudian

dibilas dengan *aquadest* minimal sebanyak 3 kali.

Penanaman eksplan dilakukan di LAFC yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Eksplan yang akan di tanam adalah kotiledon kedelai, Eksplan yang akan dikulturkan kedalam media tanam diletakkan di petridish, dimana kotiledon dipisahkan dari bagian embrio dan kulit arinya. Lalu pada setiap sisi kotiledon dipotong sedikit pada setiap sisinya dan ditanam dalam posisi bagian kotiledon yang melengkung bersentuhan dengan media. Dimana satu botol kultur terdiri dari satu eksplan. Botol kultur diletakkan di rak kultur dibawah cahaya.

Padatahapini pengamatan dilakukan dengan mengamati pertumbuhan dan perkembangan eksplan padaumur 8 MST. Peubah yang diamati berupa persentase eksplan membentuk kalus, warna kalus, tekstur kalus, histology kalus, dan bobot segar kalus total.

Analisis histologi kalus embriogenik diamati sebelum dilakukan tahap identifikasi kalus embriogenik toleran genangan. Preparat histologi dibuat dari kalus embriogenik friable berwarna putih kekuning-kuningan yang diperoleh dari masing-masing perlakuan. Pengirisan dilakukan dengan silet tajam, dan diiris tipis. Pewarnaan menggunakan Acetocarmin 2% yang dilarutkan dengan alkohol 96% sebanyak 25 ml dan Asam asetat sebanyak 25 ml. Preparat histologi diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 16x dan dipotret menggunakan kamera.

Pada tahap kedua dilakukan identifikasi kalus toleran genangan Identifikasi kalus dilakukan secara 2 tahap, yaitu tahap 1 sebelum dilakukan aplikasi penggenangan dan tahap 2 yaitu setelah dilakukan aplikasi penggenangan. Aplikasi penggenangan terhadap kalus dilakukan dengan memberikan MS0 cair pada kalus yang tumbuh sampai kalus tertutupi oleh media tersebut selama 48 jam. Dimana peubah amatan yang diamati adalah bobot segar kalus total kandungan klorofil total, konsentrasi protein, aktivitas enzim Super Oksida Dismutase (SOD) dan enzim Peroksidase (POD).

Pengukuran kandungan klorofil total menggunakan metode Arnon (1949) diukur dengan spektrofotometri. Kalus segar digerus dengan mortar, kemudian serbuk kalus diukur beratnya sebanyak 1 g. Sampel yang sudah digerus (*slurry*) kemudian diekstraksi dengan 100 ml aseton 85%, Lalu didiamkan selama 1 malam di dalam kulkas. Ekstrak tersebut disaring dengan kertas saring. Filtrat yang didapat ditempatkan dalam cuvet untuk selanjutnya diukur kandungan klorofil total dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 645 nm, dan 663 nm.

Pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode Kjedral AOAC, (1995). Sampel disiapkan dengan mengeringkan kalus segar dalam oven selama 24 jam. Sampel lalu diambil sebanyak 0,2 g yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam labu kjedral 30 ml selanjutnya ditambahkan dengan 2,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, 2 g katalis (CuSO<sub>4</sub> : K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dengan perbandingan 1:1). Sampel dididihkan selama 1-1,5 jam atau sampai cairan berwarna jernih. Labu beserta isinya didinginkan lalu ditambahkan dengan 10 ml akuades dan isinya dipindahkan ke dalam erlenmeyer. Erlenmeyer dipindahkan ke alat destilasi dan ditambahkan 10 ml larutan NaOH 40%. Erlenmeyer berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N sebelumnya ditambahkan ke dalamnya 2 – 4 tetes indikator (campuran metil merah 0,02% dalam alkohol dan metil biru 0,02% dalam alkohol dengan perbandingan 2 :1) diletakkan dibawah kondensor. Ujung tabung kondensor harus terendam dalam labu larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kemudian dilakukan destilasi hingga sekitar 125 ml destilat dalam labu erlenmeyer. Ujung kondensor kemudian dibilas dengan sedikit air destilat dan ditampung dalam erlenmeyer lalu dititrasi dengan NaOH 0,02 N sampai terjadi perubahan warna hijau menjadi ungu. Penetapan blanko dilakukan dengan cara yang sama.

Pengujian aktivitas enzim SOD diukur dengan menggunakan metode Beauchamp dan Fridovich (1971) yang dimodifikasi. Setelah kalus sebagai bahan sampel digerus dengan menambahkan PVPP secukupnya dan nitrogen cair maka akan didapat bahan sampel dalam bentuk serbuk lalu ditimbang sebanyak

0.1 g. Setelah itu buffer ekstrak disiapkan sebanyak 1 ml pada tube 1.5 ml. Lalu bahan sampel yang telah diukur tersebut dimasukkan kedalam tube yang berisi buffer ekstrak tersebut. Buffer Ekstrak dibuat dengan penambahan 50 mM buffer Potassium Phosphate (pH 7.5) dan 1 mM EDTA, dimana untuk mendapatkan hasil yang homogen disentrifius pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4°C selama 15 menit. Pada reaksi penyangga diekstrak 50 mM Buffer Potassium Phosphate sebanyak 750 µM, 13 mM L-Methionin sebanyak 50 µM, 75 mM NBT sebanyak 50 µM, 0.1 mM EDTA sebanyak 150 µM, 100 ml estrak enzim sebanyak 100 µM, 2mM Riboflavin sebanyak 50 µM lalu tabung ditempatkan pada ruang dibawah cahaya 15 watt dan dibiarkan 15 menit. Setelah itu terakhir ditambahkan *aquadest* sebanyak 350 µM dengan total volume 1.5 ml lalu larutan divortex hingga larut dan dibaca oleh spektrofotometer UV-Vis dengan absorbansi 560 nm. Satu unit enzim aktivitas SOD didefinisikan sebagai aktivitas SOD mg protein.

Pengujian aktivitas enzim POD diukur dengan pembacaan panjang gelombang di spektrofotometer UV-Vis, berdasarkan metode pada Standart Operating Procedures (1994) yang dimodifikasi dimana sebelumnya bahan analisis yaitu kalus sebagai bahan sampel digerus dengan menambahkan PVPP secukupnya dan nitrogen cair maka akan didapat bahan sampel dalam bentuk serbuk lalu ditimbang sebanyak 0.1 g. Setelah itu larutan CaCl disiapkan sebanyak 1 ml pada tube 1.5 ml. Lalu bahan sampel yang telah ditimbang tersebut dimasukkan kedalam tube tersebut dan dihomogenkan menggunakan sentrifius dengan kecepatan 10000 rpm, dengan suhu 4°C selama 15 menit. Dimana perbandingan sampel dengan volume pengenceran adalah 1 : 10. Pembuatan larutan A *phenol-aminoantipirine* (larutan Fenol 810 mg dan amino antipirine 25 mg dalam 50 ml air) dan larutan B dengan mencampurkan 30% H<sub>2</sub>O, ditambahkan dengan larutan buffer MES pH 6 perbandingan 1:100 dengan konsentrasi akhir 0.01 M. Larutan A dan B tidak dapat

dijadikan larutan stok sehingga pemakaiannya tidak dapat digunakan berulang kali. Pengukuran POD menggunakan spektrofotometer dengan absorbansi 510 nm dengan menambahkan 1.4 ml larutan A dan 1.5 ml larutan B kedalam kuvet 3 ml yang telah di *waterbath* 25°C lalu ditambahkan 200 µl ekstrak kedalam kuvet lalu diaduk.

Untuk membandingkan secara statistik karakter beberapa varietas kalus yang diteliti, maka dilakukan perbandingan antara identifikasi kalus setelah dilakukan penggenangan dengan kalus saat sebelum dilakukan penggenangan. Data dianalisis menggunakan uji t pada taraf 5% dan taraf 1% dengan menggunakan Microsoft Excel 2007 dan *software* MINITAB versi 16.1.1.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Kalus Embriogenik

Data hasil pengamatan terhadap persentase eksplan membentuk kalus akibat pemberian beberapa jenis ZPT dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan pengamatan terhadap persentase terbentuknya kalus terlihat perlakuan 2,4-D 10 mg/l terhadap varietas Gepak kuning dan Wilis telah mampu membentuk kalus pada umur 4 MST dan 8 MST. Kalus yang terbentuk umumnya berwarna putih kekuning-kuningan dan bertekstur friable. Berbeda dengan perlakuan NAA dan IAA pada Tabel 1 terlihat bahwa tidak adanya eksplan kotiledon pada tiap varietas kedelai yang mampu membentuk kalus baik itu pada umur 4 MST dan 8 MST. Hal ini disebabkan karena ZPT 2,4-D merupakan auksin yang mampu menginduksi kalus sebagai respon awal dari pertumbuhan eksplan. Hal ini sesuai dengan pendapat Rusdianto dan Indrianto (2012) yang menyatakan bahwa respon awal eksplan terhadap 2,4-D adalah pembentukan kalus sebagai wujud diferensiasi. Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisir yang awalnya merupakan jaringan penutup luka, dimana sel-sel yang pada awalnya dorman (*quiescent*) terdiferensiasi kembali (*dediferensiasi*).

Tabel 1. Persentase Eksplan Membentuk Kalus (%)

Perlakuan	4 MST	8 MST	Rataan
V <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>1</sub> A <sub>3</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	100.00	100.00	100.00
V <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	100.00	100.00	100.00
V <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00
V <sub>3</sub> A <sub>3</sub>	0.00	0.00	0.00

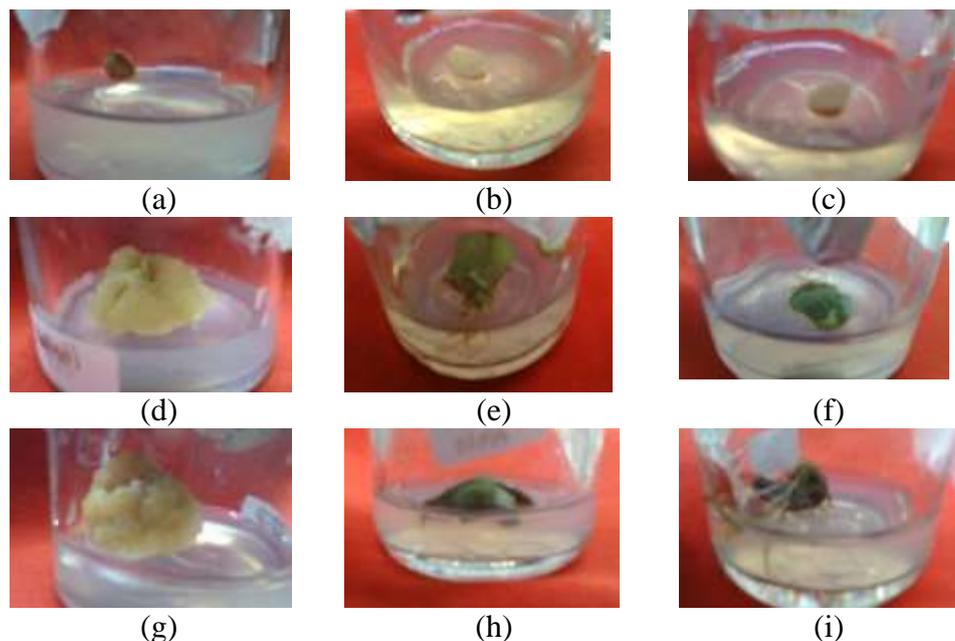
Keterangan: V<sub>1</sub> (Varietas Baluran); V<sub>2</sub> (Varietas Gepak kuning); V<sub>3</sub> (Varietas Wilis); A<sub>1</sub> (ZPT 2,4-D 10mg/l); A<sub>2</sub> (ZPT NAA 10 mg/l); A<sub>3</sub> ( ZPT IAA 10 mg/l)

Dediferensiasi terjadikarena sel-sel tumbuhan (jaringan), yang secara alamiahnya bersifat autotrof dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam mediumkultur, sehingga sel-sel membelah secara tidak terkendali membentuk massa sel yang tidakterorganisir (kalus).

Hasil pengamatan pada peubah 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.

Pada peubah tekstur kalus Gambar 1 menunjukkan bahwa pada umur 8 MST kalus yang terbentuk pada perlakuan V<sub>2</sub>A<sub>1</sub> dominan bertekstur kompak bernodul sedangkan pada perlakuan V<sub>3</sub>A<sub>1</sub> pada umur 8 MST memiliki tekstur dominan ke friable tipe II bernodul. Hal ini diduga karena medium, konsentrasi ZPT maupun varietas kedelai mempengaruhi perbedaan struktur kalus yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan pendapat Shofiyah dan Purnawanto (2010) yang menyatakan bahwa beberapa kalus ada yang mengalami pembentukan lignifikasi sehingga kalus tersebut mempunyai tekstur yang keras dan kompak. Namun ada kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi fragmen-fragmen yang kecil, kalus yang demikian dikenal dengan kalus remah (friable). Hasil yang sama dari penelitian Capuana dan Debergh (1997) menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan dari perlakuan 2,4-D mempunyai tekstur remah dan berwarna kekuningan.

Data hasil pengamatan terhadap keadaan visual kultur dapat dilihat pada Gambar 1atas pengaruh pemberian beberapa jenis ZPT terhadap keadaan visual kultur beberapa jenis varietas kedelai.



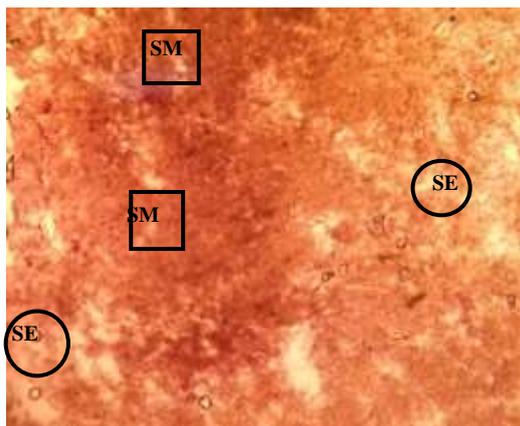
Gambar 1. Penampilan visual kultur pada umur 8 MST dengan 9 kombinasi perlakuan yaitu: (a) V<sub>1</sub>A<sub>1</sub>, (b) V<sub>1</sub>A<sub>2</sub>, (c) V<sub>1</sub>A<sub>3</sub>, (d) V<sub>2</sub>A<sub>1</sub>, (e) V<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, (f) V<sub>2</sub>A<sub>3</sub>, (g) V<sub>3</sub>A<sub>1</sub>, (h) V<sub>3</sub>A<sub>2</sub> dan (i) V<sub>3</sub>A<sub>3</sub>.

Berdasarkan analisa histologi kalus embriogenik pada kedua varietas kedelai menunjukkan bahwa pemberian ZPT 2,4-D 10 mg/l belum menunjukkan adanya sel-sel embriogenik dengan jelas pada perbesaran tersebut walaupun secara visual kalus yang dijadikan sebagai preparat penampang histologi kalus adalah kalus yang telah memiliki ciri-ciri visual sebagai penciri kalus embriogenik. Sel-sel embriogenik secara histologi pada dasarnya memiliki ciri-ciri dimana bagian tepi dengan ruang antar sel yang lebih besar dibandingkan sel meristem sedangkan sel-sel meristem sangat rapat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kasi dan Sumaryono (2008) yang menyatakan bahwa sel meristematik pada umumnya terdapat di bagian tengah sedangkan sel embriogenik terdapat di bagian tepi. Sel embriogenik mempunyai ruang antar sel yang tidak dijumpai pada sel meristem, sehingga sel-sel meristem lebih rapat. Di antara kedua jaringan tersebut terdapat sekelompok sel yang mempunyai vakuola yang besar dan bersifat paren-kimatis (yang nantinya akan

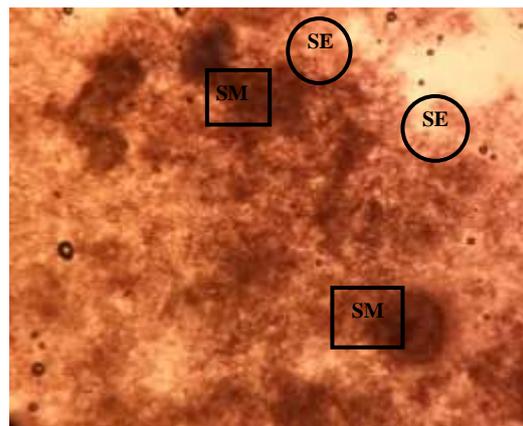
membentuk jaringan parenkim dan seperti yang dinyatakan oleh Vajrabhaya (1990) sel-sel embriogenik mempunyai ciri-ciri inti sel besar, sitoplasma padat dan dinding sel yang tebal.

Rusdianto dan Indrianto (2012) menyatakan sel yang mempunyai kemampuan menjadi embriogenik sangat tergantung pada tingkat awal diferensiasi sel serta kondisi lingkungan yang mendukungnya terutama interaksi kandungan hormon endogen dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh eksogen yang diberikan sehingga konsentrasi zat pengatur tumbuh di dalam sel berubah. Perubahan konsentrasi tersebut merupakan *triggering factor* atau faktor pemicu yang dapat mempengaruhi ekspresi gen dalam menentukan embriogenesis somatik.

Gambar hasil pengamatan terhadap analisis histologi kalus embriogenik dapat dilihat pada Gambar 2 atas pengaruh pemberian ZPT 2,4-D 10 mg/l terhadap keadaan histologi kalus varietas Gepak kuning dan Wilis.



(a)



(b)

Gambar 2. Penampang melintang kalus embriogenik friable pada (a) varietas Gepak kuning (b) varietas Wilis dengan media ZPT 2,4 -D 10 mg/l. (SM= Sel Meristem, SE= Sel Embriogenik. Perbesaran obj. 16x.

### Respon Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Setelah Penggenangan

Berdasarkan uji t pada perlakuan  $V_{2A_1}$  yaitu varietas Gepak kuning dengan pemberian media ZPT 2.4-D 10 mg/l menunjukkan pengaruh nyata terhadap peningkatan bobot segar kalus total sebelum dan setelah penggenangan (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa setiap varietas mempengaruhi produktivitas dari hasil tanaman, dimana untuk mencapai produktivitas yang tinggi sangat dipengaruhi oleh varietas yang ditanam. Hal ini sesuai dengan pendapat Irwan (2006) yang menyatakan bahwa varietas memegang peranan penting dalam perkembangan penanaman kedelai karena untuk mencapai produktivitas yang tinggi sangat ditentukan oleh potensi daya hasil dari varietas unggul yang ditanam. Potensi hasil biji di lapangan masih dipengaruhi oleh interaksi antara faktor genetik varietas dengan pengelolaan kondisi lingkungan tumbuh. Bila pengelolaan lingkungan tumbuh tidak dilakukan dengan baik, potensi daya hasil biji yang tinggi dari varietas unggul tersebut tidak dapat tercapai.

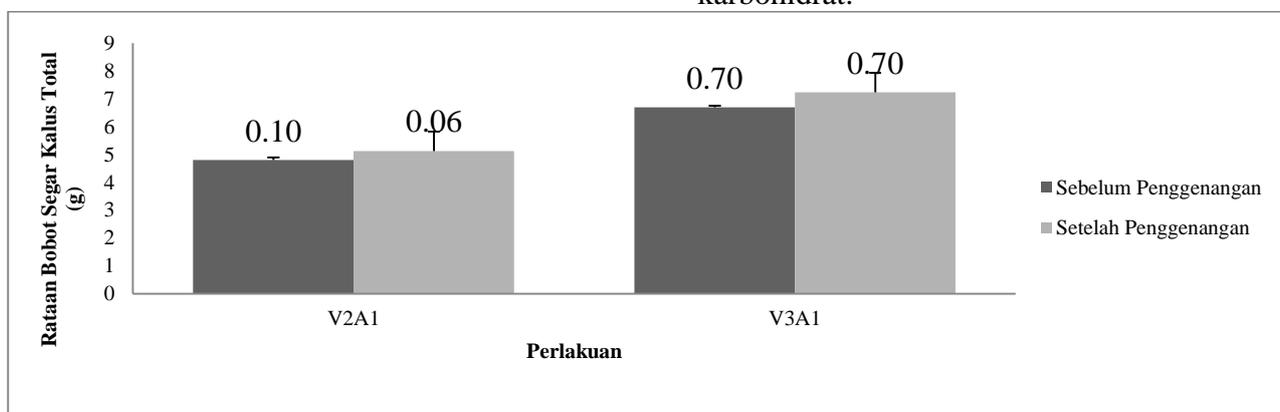
Berdasarkan uji t pada kedua perlakuan menunjukkan hasil tidak berpengaruh nyata terhadap penurunan kandungan klorofil total sebelum dan setelah penggenangan (Gambar 4). Dimana  $V_{2A_1}$  merupakan perlakuan dengan kandungan

klorofil total tertinggi baik pada saat sebelum dan setelah penggenangan dibandingkan dengan perlakuan  $V_{3A_1}$ . Pada Gambar 4 terlihat pada kedua perlakuan menunjukkan penurunan kandungan klorofil total setelah dilakukan proses penggenangan. Hal ini disebabkan karena kalus setelah dilakukan penggenangan mengalami gangguan metabolisme sehingga proses fotosintesis terganggu. Hal ini sesuai dengan pendapat Bidwell (1979) yang menyatakan bahwa gangguan terhadap metabolisme akibat anaerobik akan menghambat produksi ATP, Pengaruh  $CO_2$  juga di dalam kultur jaringan berkaitan erat dengan kebutuhan bagi proses fotosintesis. Secara umum diduga bahwa  $CO_2$  merupakan syarat mutlak untuk kultur jaringan tanaman tingkat tinggi dibawah kondisi cahaya.

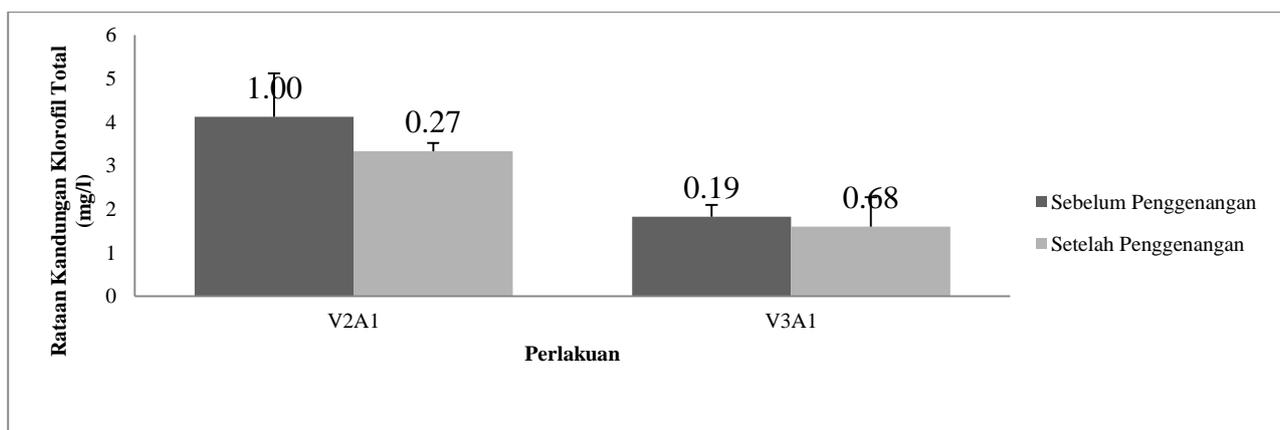
Berdasarkan uji t pada kedua perlakuan menunjukkan hasil tidak berpengaruh nyata terhadap peningkatan dan penurunan konsentrasi protein sebelum dan setelah penggenangan (Gambar 5). Dimana perlakuan  $V_{2A_1}$  dengan konsentrasi protein tertinggi mengalami peningkatan konsentrasi protein setelah penggenangan. Berbeda halnya dengan perlakuan  $V_{3A_1}$  terlihat pada perlakuan ini memberikan respon penurunan konsentrasi protein setelah dilakukan proses penggenangan. Adanya perbedaan hasil akhir konsentrasi ini diduga bahwa varietas Gepak kuning pada perlakuan

V<sub>2</sub>A<sub>1</sub> menunjukkan sifat tahan terhadap kondisi penggenangan secara *in vitro*. Sedangkan pada varietas Wilis pada perlakuan V<sub>3</sub>A<sub>1</sub> mengalami penurunan konsentrasi, hal tersebut diduga karena varietas ini tidak tahan terhadap kondisi penggenangan sehingga terjadi proses denitrifikasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Imelda *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa cekaman lingkungan dapat mempengaruhi aktivitas gen dan menentukan kapan, bagaimana dan berapa banyak suatu enzim/protein dapat diproduksi dalam organ atau jaringan tanaman.

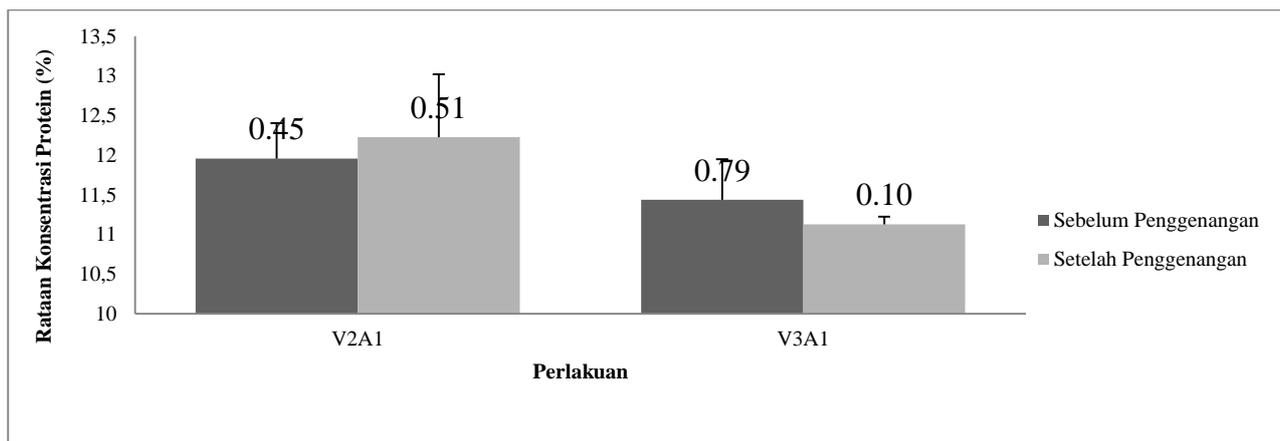
Suwignyo (2007) menyatakan bahwa oksigen berfungsi sebagai akseptor elektron dalam jalur fosforilasi oksidatif yang menghasilkan ATP yang merupakan sumber energi utama dalam metabolisme seluler. Proses fermentasi menyebabkan jumlah energi yang dihasilkan menjadi lebih sedikit (pada fermentasi dihasilkan hanya 2 mol ATP untuk setiap mol glukosa, sedangkan pada proses metabolisme oksidatif dihasilkan 36 mol). Dalam kondisi anoksia, jaringan padi mensintesis lebih banyak solubel protein. Sebagian besar anaerobik protein ini adalah enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat.



Gambar 3. Bobot segar kalus total (g) dari genotipe kedelai Gepak kuning (V<sub>2</sub>) dan Wilis (V<sub>3</sub>) yang diinduksi pada media ZPT 2,4-D 10 mg/l (A<sub>1</sub>) sebelum dan setelah penggenangan.



Gambar 4. Klorofil total (mg/l) dari genotipe kedelai Gepak kuning (V<sub>2</sub>) dan Wilis (V<sub>3</sub>) yang diinduksi pada media ZPT 2,4-D 10 mg/l (A<sub>1</sub>) sebelum dan setelah penggenangan.

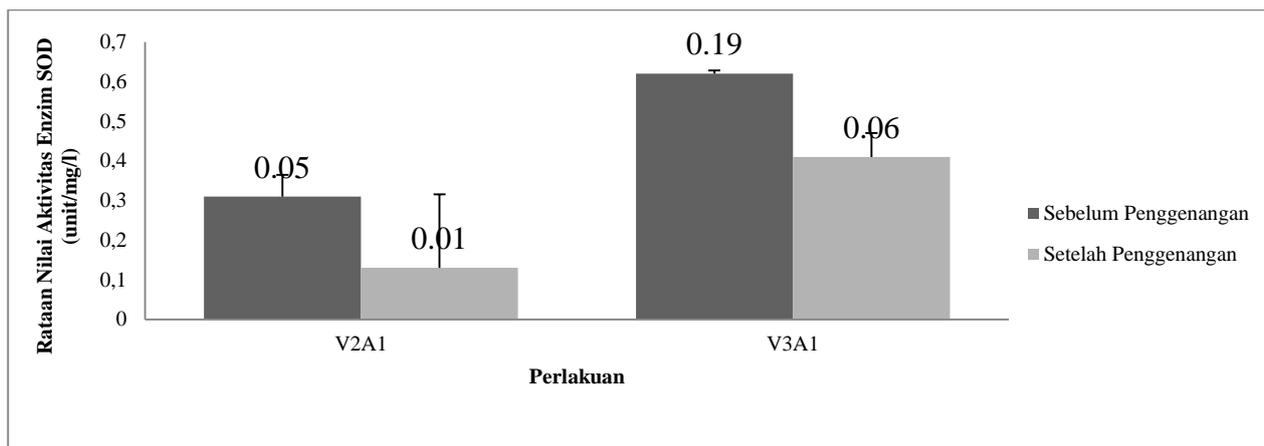


Gambar 5. Konsentrasi protein (%) dari genotipe kedelai Gepak kuning ( $V_2$ ) dan Wilis ( $V_3$ ) yang diinduksi pada media ZPT 2,4-D 10 mg/l ( $A_1$ ) sebelum dan setelah penggenangan.

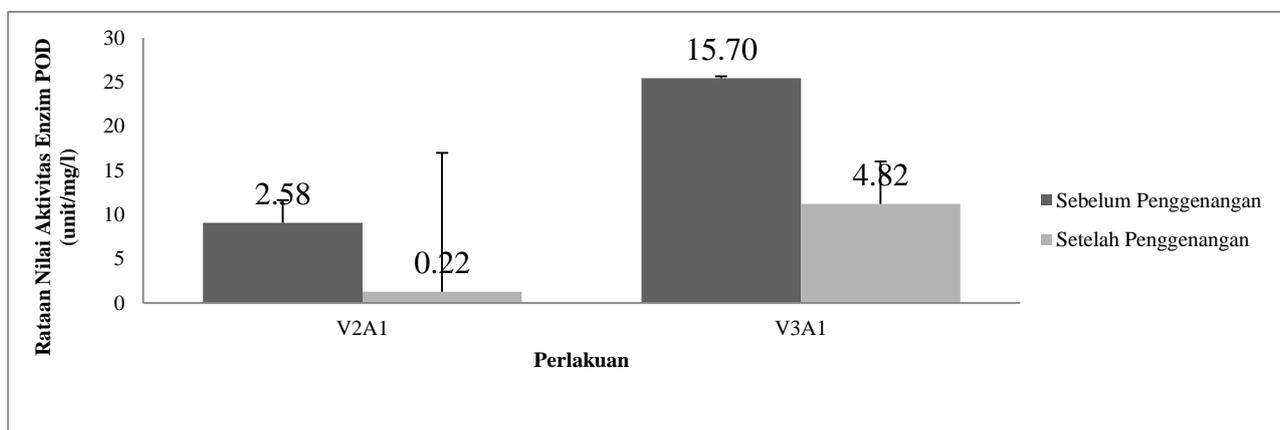
Berdasarkan uji t pada perlakuan  $V_2A_1$  menunjukkan pengaruh nyata terhadap penurunan aktivitas enzim SOD sebelum dan setelah penggenangan (Gambar 6). Aktivitas enzim SOD tertinggi terdapat pada perlakuan  $V_3A_1$  baik pada saat sebelum dan setelah penggenangan yaitu sebesar 0.62 unit/mg/l sedangkan pada perlakuan  $V_2A_1$  nilai rata-ratanya sebesar 0.31 unit/mg/l. Setelah penggenangan aktivitasnya semakin menurun pada kedua perlakuan, dengan rata-rata tertinggi tetap pada perlakuan  $V_3A_1$  yaitu sebesar 0.41 unit/mg/l sedangkan perlakuan  $V_2A_1$  sebesar 0.13 unit/mg/l. Hal ini disebabkan karena akibat terjadinya penggenangan sel-sel pada kalus mengalami kerusakan oksidatif akibat adanya kelompok  $O_2$  reaktif seperti:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  dan OH, sehingga enzim-enzim antioksidan endogen pada sel kalus tersebut terpakai sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim SOD pada kalus tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat Astuti (2008) yang menyatakan bahwa sel yang normal mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang bereaksi sebagai antioksidan endogen untuk mendetoksifikasi radikal bebas dan mencegah

kerusakan sel. Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain oleh aktivitas dan kandungan enzim antioksidan endogen. Peningkatan radikal bebas dalam tubuh akan meningkatkan pemakaian enzim antioksidan intrasel sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim SOD sebagai salah satu sistem antioksidan endogen dalam tubuh.

Jadhav *et al.* (1996) dalam Astuti (2008) menyatakan bahwa dalam cairan intraseluler, enzim yang berperan pada proses degradasi senyawa ROS meliputi enzim superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida ( $O_2^-$ ) menjadi  $H_2O_2$  dan molekul oksigen; enzim katalase mendegradasi  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen; serta enzim glutathione peroxidase yang mengkatalisis reduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dengan menggunakan glutathione tereduksi (GSH) dan glutathione teroksidasi (GSSG) sebagai kofaktor. Nutrisi memainkan peranan kunci dalam menjaga pertahanan enzim tubuh terhadap radikal bebas.



Gambar 6. Aktivitas enzim SOD (unit/mg/l) dari genotipe kedelai Gepak kuning (V<sub>2</sub>) dan Wilis (V<sub>3</sub>) yang diinduksi pada media ZPT 2,4-D 10 mg/l (A<sub>1</sub>) sebelum dan setelah penggenangan.



Gambar 7. Aktivitas enzim POD (unit/mg/l) dari genotipe kedelai Gepak kuning (V<sub>2</sub>) dan Wilis (V<sub>3</sub>) yang diinduksi pada media ZPT 2,4-D 10 mg/l (A<sub>1</sub>) sebelum dan setelah penggenangan

Berdasarkan hasil uji t pada perlakuan V<sub>2</sub>A<sub>1</sub> menunjukkan pengaruh nyata terhadap penurunan aktivitas enzim POD sebelum dan setelah penggenangan (Gambar 7). Dimana terlihat bahwa rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan V<sub>3</sub>A<sub>1</sub> baik pada saat sebelum dan setelah penggenangan. Pada saat sebelum penggenangan rata-rata nilai aktivitas enzim POD tertinggi sebesar 25.42 unit/mg/l sedangkan pada perlakuan V<sub>2</sub>A<sub>1</sub> sebesar 11.20 unit/mg/l. Dan setelah penggenangan

aktivitasnya semakin menurun pada kedua perlakuan, dengan rata-rata tertinggi tetap pada perlakuan V<sub>3</sub>A<sub>1</sub> yaitu sebesar 1.27 unit/mg/l sedangkan perlakuan V<sub>2</sub>A<sub>1</sub> sebesar 0.13 unit/mg/l. Penurunan aktivitas enzim POD ini diduga bahwa kedua varietas pada perlakuan ini belum dapat menunjukkan varietas yang tahan terhadap kondisi penggenangan. Hal ini sesuai dengan pendapat Agrios (2005) yang menyatakan bahwa pada tanaman yang tahan terjadi peningkatan aktivitas peroksidase, sedangkan pada tanaman yang peka tidak ada perubahan atau bahkan turun dibandingkan dengan keadaan sehat. Selanjutnya Astuti (2008) menyatakan bahwa pada keadaan patologik diantaranya akibat terbentuknya radikal bebas dalam jumlah berlebihan,

enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya. Oleh karena itu, jika terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh, dibutuhkan antioksidan eksogen dalam jumlah yang lebih banyak untuk mengeliminir dan menetralkan efek radikal bebas.

### SIMPULAN

Varietas Gepak kuning dan Wilis merupakan varietas yang lebih responsif terhadap pertumbuhan kalus embriogenik atas pemberian media, sedangkan varietas Baluran tidak menunjukkan aktivitas pertumbuhan. Pemberian media dengan ZPT 2,4-D 10 mg/l terhadap eksplan kotiledon kedelai telah mampu menunjukkan aktivitas pertumbuhan kalus embriogenik sedangkan pemberian media dengan ZPT NAA dan IAA 10 mg/l lebih mengarah kepada pembentukan akar. Kombinasi antara pemberian media ZPT 2,4-D 10 mg/l dengan varietas Gepak kuning menunjukkan pengaruh nyata terhadap peningkatan bobot segar kalus total, penurunan aktivitas enzim SOD dan POD sedangkan kombinasi pemberian media ZPT 2,4-D 10 mg/l dengan varietas Wilis tidak berpengaruh nyata terhadap seluruh peubah amatan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Ed ke-5. Academic Press, San Diego.
- AOAC. 1995. Official Methods of analysis of the association of official analytical chemist washington ; AOAC.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. *Plant physiology* 24 (1): 1-15.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon kedelai dan potensinya sebagai penangkap radikal bebas. Fakultas pertanian Universitas Lampung. *J.Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2):126-136.
- Beauchamp, C. dan I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal.Biochem. Review* 44: 276-287.
- Bidwell, R. G. 1979. *Plant Physiology* 2nd edition. New York Macmillan Publishing.
- Capuana, M. dan P. C. Debergh. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chesnut somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org.Cult.* 48:23-29.
- Fauziyyah, D., T. Hardiyati dan Kamsinah. 2012. Upaya memacu pembentukan kalus eksplan embrio kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan sukrosa secara kultur *in vitro*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman , Purwokerto. *Jurnal Pembangunan Pedesaan* 12(1): 30-37.
- Gunawan, L.W. 1987. *Teknik kultur jaringan tumbuhan*. IPB-Press, Bogor.
- Hapsari, R. T. dan M. M. Adie. 2010. Peluang perakitan dan pengembangan kedelai toleran genangan. Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Bogor. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(2).
- Harjanti, R. A. 2012. Sistem pengairan Intermittent pada System Rice of Intensification (SRI) terhadap pertumbuhan dan hasil padi (*Oryza sativa* L.) *Makalah Seminar Umum (PNB 4080)* Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Imelda, M., Estiati, A. and Hartati, N.S. 2001. Induction of mutation through gamma irradiation in three cultivars of banana. *J. Annalae Bogorienses* 7(2): 75-82.
- Irwan, A.W. 2006. Budidaya tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Kasi, D. dan Sumaryono. 2008. Perkembangan

- Perkembangan kalus embriogenik sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) pada tiga sistem kultur in vitro. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor.
- Kemeterian Pertanian. 2015. Pedoman teknis pengelolaan produksi kedelai tahun 2015. Direktorat Budidaya Aneka Kacang dan Umbi. Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, Kementerian Pertanian.
- Mapegau. 2006. Pengaruh Cekaman Air terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Kedelai (*Glycine max* L. Merr). Fakultas Pertanian Universitas Jambi, Jambi. *Jurnal Ilmiah Pertanian Kultura*. 41(1):43-51.
- 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.
- Shofiyah, A. dan A. M. Purnawanto. 2010. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan Benzil Amino Purin (BAP) terhadap pembentukan kalus pada eksplan daun Kencur (*Kaemferia galangi* L.) secara in vitro. *Laporan Penelitian Dosen Muda*. Fakultas Pertanian. Universitas MuhammadiyahPurwokerto, Purwokerto.
- Standart Operating Procedures. 1994. Plant peroxidase activity determination. Serras, US.
- Suhartina. 2005. Deskripsi varietas unggul kacang-kacangan dan umbi-umbian. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang.
- Suriadikarta, D.A. dan M.T. Sutriadi. 2007. Jenis-jenis lahan berpotensi untuk pengembangan pertanian di lahan rawa. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 26(3): 115–122.
- Suwignyo, R.A. 2007. Ketahanan tanaman padi terhadap kondisi terendam: pemahaman terhadap karakter fisiologis untuk mendapatkan kultivar padi yang toleran di lahan rawa lebak. Kongres Ilmu Pengetahuan Wilayah Indonesia Bagian Barat.Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Vajrabhaya, M.1990.Somatic embryogenesis, training course on advanced techniques of tissue culture for tree improvement, Bogor.