

Karakteristik Kalus Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dengan Pemberian 2,4D dan Kinetin pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro

Characteristic of callus on several soybean varieties by giving several combination of 2,4 D and Kinetin at Hypoxic Condition.

Dian Simbolon, Revandy I M Damanik* dan Rosmayati

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian USU Medan 20155

*Corresponding author: d_revandy@hotmail.com

ABSTRACT

This research aimed to know the characteristic of callus on some varieties of soybean in hypoxic condition. This research was carried out in The Tissue Culture Laboratory Faculty of Agriculture, University of North Sumatera, Medan. This research conducted from March until October 2016. This research used factorial Completely Randomized Design with three factors were varieties, combination of Plant Growth Regulator (PGR) and Hypoxic treatment. The parameters measured are visualization of callus, percentage of growth callus, percentage of weight callus, the amount of chlorophyll, concentration of protein, analysis to activity of superoxide dismutase (SOD) and activity of peroxidase (POD). The results showed that varieties give significant effect to weight callus and the amount of chlorophyll. Plant Growth Regulator give significant effect to weight callus and SOD enzyme. Hypoxic treatment give significant effect to weight callus, the amount of chlorophyll, SOD and POD enzyme. Interaction between varieties and Plant Growth Regulator give significant effect to POD enzyme. Interaction between varieties, Plant Growth Regulator and flooding treatment has no significant effect to all the treatments.

Keywords: 2,4-D, hypoxic, in vitro, kinetin, soybean

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik kalus pada berbagai varietas kedelai dengan pemberian kombinasi 2,4D dan Kinetin pada kondisi hipoksia secara in vitro. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Universitas Sumatera Utara pada bulan Maret sampai Oktober 2016 menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga faktor perlakuan yaitu varietas yang diuji (Baluran, Gepak Kuning dan Willis), kombinasi ZPT (5 mg/l 2,4D; 10 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l Kinetin; 15 mg/l 2,4D + 1 mg/l Kinetin) dan perlakuan penggenangan. Hasil analisis data menunjukkan bahwa varietas berpengaruh nyata terhadap bobot kalus dan kandungan klorofil. Zat pengatur tumbuh berpengaruh nyata terhadap bobot kalus dan enzim SOD. Perlakuan penggenangan berpengaruh nyata terhadap bobot kalus, kandungan klorofil, enzim SOD dan enzim POD. Interaksi antara varietas dan zat pengatur tumbuh berpengaruh nyata terhadap enzim POD. Interaksi antara varietas, zat pengatur tumbuh dan penggenangan tidak berpengaruh nyata terhadap semua perlakuan.

Kata kunci: 2,4-D, hipoksia, in vitro, kedelai, kinetin

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan sumber protein nabati utama bagi sebagian besar penduduk Indonesia. Sampai saat ini kedelai masih

menjadi salah satu komoditas pangan yang sangat penting di Indonesia. Dalam rangka meningkatkan ketahanan pangan di tingkat nasional khususnya ketersediaan bahan pangan kedelai, diperlukan upaya yang

sungguh-sungguh untuk meningkatkan produksinya dan tentunya harus diprogramkan secara teliti, terencana, berjangka panjang dan tepat sasaran. Pemanfaatan utama kedelai adalah dari biji. Biji kedelai kaya protein dan lemak serta beberapa bahan gizi penting lain, misalnya vitamin (asam fitat) dan lesitin. Biji yang diolah menjadi tepung kedelai secara garis besar dapat dibagi menjadi 2 kelompok manfaat utama, yaitu olahan dalam bentuk protein kedelai dan minyak kedelai (Oshorella, 2011).

Kebutuhan kedelai meningkat setiap tahunnya sehingga menimbulkan tantangan yang berat bagi pembangunan pertanian kedelai, tantangan ini semakin berat karena di satu sisi laju permintaan terus meningkat, akan tetapi disisi lain muncul beberapa permasalahan diantaranya keterbatasan lahan yang sempit. 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 atau 33,91 % dari kebutuhan sedangkan berdasarkan ARAMII tahun 2014 baru mencapai 921.336 ton atau 40,06% (Kementerian Pertanian, 2015).

Pemanasan global menyebabkan peningkatan curah hujan dan kenaikan permukaan laut sehingga banyak lahan pertanian yang tergenang. Tersedianya varietas kedelai yang adaptif pada kondisi tersebut memberikan arti penting dalam rangka percepatan peningkatan produksi kedelai dalam negeri. Untuk mengatasi pengaruh genangan, pemilihan varietas toleran terhadap keadaan tersebut perlu dilakukan, metode seleksi untuk memilih varietas toleran terhadap genangan dapat dilakukan di lapang atau di laboratorium. Viabilitas benih pada kondisi suboptimum dapat dideteksi dan dilakukan di rumah kaca atau di laboratorium dengan mengecambahkan benih pada media yang dapat dikontrol dan praktis seperti metode kultur jaringan (Hapsari dan Adie, 2010).

Dalam membantu proses uji coba varietas kedelai yang tahan terhadap fase

penggenangan, kultur jaringan merupakan teknik yang dipromosikan, karena dengan adanya metode melalui seleksi *in vitro* akan menghasilkan varietas baru yang tahan terhadap cekaman biotik dan abiotik dengan sifat yang diwariskan. Selain itu teknik ini lebih efisien karena kondisi seleksi dapat dibuat homogen, tempatnya relatif lebih sedikit, dan efektif selesai lebih tinggi. Penggunaan teknik *in vitro* akan menghasilkan populasi sel varian melalui seleksi pada media yang sesuai (Suwignyo, 2007).

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% diantaranya berpotensi sebagai lahan pertanian. Untuk mendukung peningkatan produksi kedelai tersebut melalui penanaman varietas unggul toleran genangan diantaranya Baluran, Gepak Kuning dan Willis maka produksi kedelai pada lahan di Indonesia dapat dioptimalkan (Suriadikarta dan Satria, 2007). Berdasarkan uraian diatas penulis tertarik untuk melakukan penelitian terhadap identifikasi kalus embriogenik pada beberapa varietas kedelai dengan pemberian kombinasi ZPT 2,4D dan kinetin pada 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 pada bulan Maret 2016 sampai dengan Oktober 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 Willis, 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 dan Kinetin, 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 H₂SO₄ pekatkatalis (CuSO₄:K₂SO₄ 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* (L AFC), timbangan analitik, pipet tetes, alat sterilisasi (autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, termometer, lampu *fluourescens*, *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 meliputi dua kegiatan yang dilakukan secara bertahap, yaitu pembentukan kalus embriogenik dan pertumbuhan dan perkembangam kalus pada kondisi Hipoksia. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial terdiri dari tiga faktor yaitu varietas yang diuji (D1=Baluran; D2=Gepak Kuning;

D3=Willis), zat pengatur tumbuh (K1=5 mg/l 2,4D; K2= 10 mg/l 2,4D+ 0,5 mg/l Kinetin; K3= 15 mg/l 2,4D+1 mg/l Kinetin), penggenangan (P1= tanpa penggenangan; P2= penggenangan dengan MS 0 cair).

Jumlah ulangan sebanyak 3 ulangan dengan jumlah perlakuan yaitu 12 kombinasi. Jumlah varietas yaitu 3 varietas dimana jumlah eksplan tiap tabung uji adalah 1 tanaman dengan jumlah seluruh eksplan sebanyak 36 eksplan dan jumlah seluruh botol yaitu 36 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 L AFC 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 *aquadest* steril minimal 3 kali. Lalu direndam kembali dalam larutan *Benlate* kemudian digojok selama 30 menit. selanjutnya dibilas dengan *aquadest* steril minimal sebanyak 3 kali. Setelah itu eksplan direndam dalam larutan *Chlorox* 10% selama 15 menit sambil digojok, kemudian dibilas dengan *aquadest* 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 L AFC 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.

Pada tahap ini pengamatan dilakukan dengan mengamati pertumbuhan dan perkembangan eksplan pada umur 8 MST. Peubah yang diamati berupa persentase eksplan membentuk kalus, warna kalus, tekstur kalus.

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 Kjeldhal AOAC. 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 kjedhal 30 ml selanjutnya ditambahkan dengan 2,5 ml H₂SO₄ pekat, 2 g katalis (CuSO₄ : K₂SO₄ dengan perbandingan 1:1). Sampel dididihkan selama 1-1,5 jam atau sampai cairan bewarna 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 H₂SO₄ 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 H₂SO₄, 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 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 absorban 510 nm dengan menambahkan 1.4 ml larutan A dan 1.5 ml larutan B kedalam 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 ekstrak 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 *aquades* 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 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 CaCl₂ 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 4⁰ C selama 15 menit. Dimana perbandingan sampel dengan volume pengenceran adalah 1 : 10. Pembuatan larutan A *phenol-aminoantipirine* (larutan Fenol 810 mg dan berulang kali. Pengukuran POD menggunakan spektrofotometer dengan kuvet 3 ml yang telah di *waterbath* 25⁰ C lalu ditambahkan 200 µl ekstrak kedalam kuvet lalu diaduk.

Jika perlakuan (Varietas yang diuji, jenis ZPT dan interaksi) berbeda nyata dalam sidik ragam maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) dengan taraf 5% (Gomez dan Gomez, 2007). Analisis dilakukan menggunakan software Costat for Window.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Terbentuk Kalus (%)

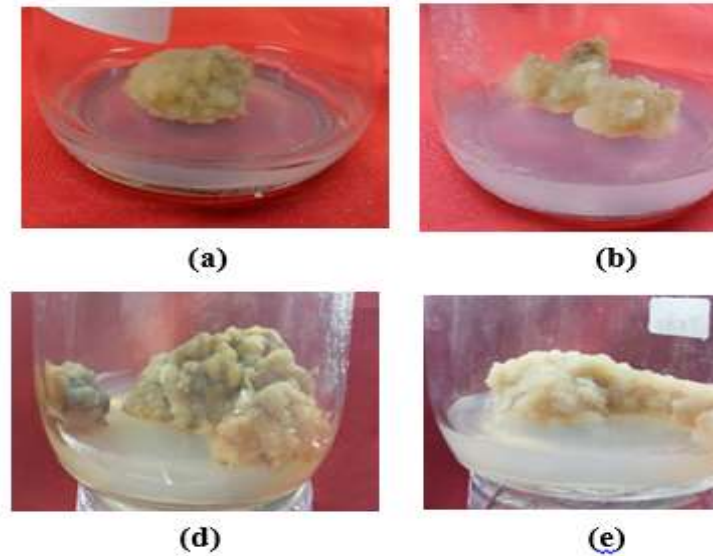
Hasil penelitian menunjukkan persentase pertumbuhan kalus untuk varietas Baluran (D1K1, D1K2, D1K3) adalah 0% dikarenakan semua eksplan tidak tumbuh dan tidak dimasukkan kedalam sidik ragam. Sedangkan untuk varietas Gepak Kuning (D2K1, D2K2, D2K3) dan Varietas Willis (D3K1, D3K2, D3K3) memiliki tingkat persentase pertumbuhan kalus adalah 100%. Varietas Baluran tidak tumbuh diduga karena benih tidak dapat merespon signal hormonal dan signal lingkungan tempat tumbuhnya akibat kerusakan dari benih tersebut. Menurut Liptan (2000) pada umumnya tanaman memiliki perbedaan fenotip dan genotip. Perbedaan varietas cukup besar mempengaruhi perbedaan sifat dalam tanaman. Keragaman penampilan tanaman terjadi akibat sifat dalam tanaman (genetik) atau perbedaan lingkungan keduanya. Perbedaan susunan genetik merupakan salah satu faktor penyebab keragaman penampilan tanaman.

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan visual

amino antipirine 25 mg dalam 50 ml air) dan larutan B dengan mencampurkan 30% H₂O, 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 kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Berdasarkan hasil penelitian, warna kalus pada perlakuan D2K1 untuk setiap ulangan umumnya menunjukkan warna putih, perlakuan D2K2 menghasilkan kalus yang berwarna putih kekuningan, pada perlakuan D2K3 kalus yang dihasilkan pada ketiga ulangan umumnya berwarna coklat. Pada ketiga ulangan, perlakuan D3K1 dan D3K2 umumnya menghasilkan warna kalus putih sementara itu pada perlakuan D3K3 menghasilkan warna kalus putih kekuningan. Berdasarkan penelitian Purnamaningsih dan Misky (2011) menyatakan bahwa warna kalus yang masih menunjukkan warna kekuningan menunjukkan bahwa kalus tersebut masih aktif berdiferensiasi. Kalus yang berwarna kecoklatan menandakan bahwa kalus mulai mengalami oksidasi dan gejala browning (pencoklatan) menyebabkan perkembangan kalus menjadi lambat, sehingga proses diferensiasi sel juga berjalan lambat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tekstur kalus dari seluruh perlakuan menghasilkan tekstur yang kompak (Gambar 1). Menurut George *and* Sherrington (1984) jenis auksin yang sama menyebabkan tipe kalus menjadi homogen serta jenis auksin akan mempengaruhi tipe kalus bila di subkultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tekstur kalus dari seluruh perlakuan menghasilkan tekstur yang kompak (Gambar 1). Menurut George *and* Sherrington (1984) jenis auksin yang sama menyebabkan tipe kalus menjadi homogen serta jenis auksin akan mempengaruhi tipe kalus bila di subkultur. Berdasarkan tekstur dan komposisi selnya, kalus dapat dibedakan menjadi kalus yang kompak dan remah. Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat

mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Penelitian Sugiyarto dan Paramita (2014) menyatakan bahwa kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (non friable). Kalus kompak mempunyai tekstur padat dan keras, yang



Gambar 1. Keadaan visual kalus pada setiap perlakuan yaitu: (a) D2K1 (b) D2K2 (c) D2K3 (d) D3K1 (e) D3K2 (f) D3K3

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap perlakuan menghasilkan kalus yang mempunyai tipe perkembangan globular. Pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa setiap kalus mengalami pembentukan embriogenik pada fase globular. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dodeman (1997) yang menyatakan bahwa perkembangan sel-sel embriogenik ditandai ketika sebagian besar dari sel-sel mulai berdiferensiasi dan ukurannya bertambah besar menjadi sel bentuk globular.

Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Pada Kondisi Hipoksia

Bobot Kalus (g)

Hasil sidik ragam diperoleh bahwa perlakuan varietas, zat pengatur tumbuh dan penggenangan berpengaruh sangat nyata terhadap bobot kalus namun tidak ada interaksi yang nyata terhadap bobot kalus.

Berdasarkan hasil pengamatan pada Tabel 1, diketahui bahwa varietas D2 (Gepak Kuning) memiliki nilai rata-ratan tertinggi yaitu 4,75 g berbeda nyata dengan

varietas D1 (Willis) dengan nilai rata-ratan lebih rendah yaitu 4,36 g. Pada faktor zat pengatur tumbuh dapat dilihat bahwa rata-ratan bobot kalus tertinggi pada perlakuan K3

yaitu 5,16 g dan terendah pada perlakuan K1 yaitu 4,15 g.

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa yang dapat menstimulasi pertumbuhan tanaman menjadi lebih baik. Biomassa kalus dapat berkembang dengan cepat dikarenakan pemberian zat pengatur tumbuh yang tepat. Hal ini sesuai dengan literatur Wattimena *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik yang aktif dalam jumlah kecil yang disintesis pada tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis. ZPT yang umum digunakan untuk menumbuhkan organ-organ baru dalam kultur *in-vitro* adalah golongan auksin dan sitokinin. Biomassa yang dihasilkan pada kultur jaringan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri,

memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi auksin-sitokinin tertentu dalam konsentrasi

yang tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor luar seperti intensitas cahaya dan temperatur.

Tabel 1. Rataan Bobot Kalus (g)

Perlakuan	Rataang.....
Varietas	
D2 (Gepak Kuning)	4,75 a
D3 (Willis)	4,36 b
Zat Pengatur Tumbuh	
K1 (5 mg/l 2,4D)	4,15 b
K2 (10 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin)	4,36 b
K3 (15 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin)	5,16 a
Penggenangan	
P1 (Tanpa Penggenangan)	4,27 b
P2 (Penggenangan dengan MS 0 cair)	4,84 a

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan pengaruh nyata pada uji DMRT pada taraf kepercayaan 5% pada kolom atau baris yang sama

Hasil pengamatan sidik ragam pada faktor penggenangan menunjukkan bahwa P1 berbeda nyata dengan P2 yang memiliki nilai rataan tertinggi yaitu 4,84 g. Hal ini terjadi diduga karena setiap varietas dikendalikan oleh banyak gen dan susunan genetik yang berbeda-beda, dimana susunan genetik yang berbeda menyebabkan keragaman dalam penampilan yang diekspresikan dalam suatu fase pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan literatur Sitompul dan Guritno (1995) yang menyatakan bahwa perbedaan susunan genetik merupakan salah satu faktor penyebab keragaman penampilan tanaman. Program genetik dapat diekspresikan pada suatu fase pertumbuhan yang berbeda dapat diekspresikan pada suatu fase pertumbuhan yang berbeda sehingga menyebabkan munculnya berbagai sifat pada tanaman yang mencakup bentuk dan fungsi tanaman.

Penggenangan menunjukkan pengaruh yang sangat nyata terhadap bobot kalus, dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa rataan bobot kalus setelah diberikan perlakuan penggenangan lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa penggenangan. Hal ini diduga bahwa

pengaruh penggenangan menyebabkan penambahan pada bobot kalus. Menurut Nur dan Dini (2013) pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang irreversible, sehingga pengukuran berat

segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus.

Klorofil Total (mg/l)

Pengamatan sidik ragam terhadap klorofil total (mg/l) menunjukkan bahwa varietas dan penggenangan berpengaruh sangat nyata terhadap nilai klorofil total. Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa varietas Gepak Kuning memiliki rataan nilai klorofil total tertinggi yaitu 4,51 mg/l dan berbeda nyata dengan varietas Willis dengan nilai rataan klorofil total 4,00 mg/l.

Berdasarkan tabel dapat dilihat bahwa nilai klorofil total sebelum dan sesudah penggenangan mengalami penurunan. Hasil pengamatan sidik ragam menunjukkan bahwa faktor penggenangan menunjukkan bahwa P1 berbeda nyata dengan P2 dimana nilai rataan total klorofil tertinggi yaitu pada perlakuan tanpa penggenangan (P1) yaitu 4,63 mg/l. Pada kondisi ini diduga bahwa pengaruh

penggenangan menyebabkan nilai klorofil total menurun. Hal ini sesuai dengan pendapat Bidwell (1979) bahwa gangguan terhadap metabolisme akibat anaerobik akan menghambat produksi ATP, pengaruh CO₂

juga didalam kultur jaringan berkaitan erat dengan kebutuhan bagi proses fotosintesis. Secara umum diduga bahwa CO₂ merupakan syarat mutlak untuk kultur jaringan tanaman dibawah kondisi cahaya.

Tabel 2. Rataan Klorofil Total (mg/l)

Perlakuan	Zat Pengatur Tumbuh			Rataan
	K1	K2	K3	
mg/l.....			
Varietas				
D2 (Gepak Kuning)	4,74	4,04	4,75	4,26 a
D3 (Willis)	3,60	4,23	4,17	4,00 b
Penggenangan				
P1 (Tanpa Penggenangan)	4,61	4,49	4,80	4,63 a
P2 (Penggenangan dengan MS 0 cair)	3,74	3,79	4,12	3,88 b
Rataan	4,17	4,14	4,46	4,26

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan pengaruh nyata pada uji DMRT pada taraf kepercayaan 5% pada kolom atau baris yang sama
- Zat Pengatur Tumbuh K1= 5 mg/l 2,4D; K2= 10 mg/l 2,4D+ 0,5 mg/l Kinetin; K3= 15 mg/l 2,4D+ 1 mg/l Kinetin.

Aktivitas Enzim SOD dan Enzim POD (unit/mg/l protein)

Hasil pengamatan dan sidik ragam dari aktivitas enzim Superoksidas Dismutase (SOD) dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan pengamatan sidik ragam menunjukkan bahwa baik zat pengatur tumbuh maupun penggenangan, keduanya menunjukkan pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas enzim SOD namun tidak ada dari interaksi serta varietas yang menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas enzim SOD. Tabel rataan terhadap aktivitas enzim SOD dapat dilihat dari Tabel 3. Berdasarkan hasil pengamatan pada parameter uji aktivitas SOD menunjukkan rataan tertinggi pada varietas terdapat pada varietas Willis (0.92 unit/mg/l protein). Nilai rataan dari faktor zat pengatur tumbuh tertinggi yaitu dengan penggunaan konsentrasi K1 yaitu 1,09 unit/mg/l protein) berbeda nyata dengan K2 dan K3. Faktor perlakuan penggenangan sendiri memiliki rataan tertinggi pada perlakuan P1 (1,01 unit/ppm) berbeda nyata dengan perlakuan P2.

Berdasarkan pengamatan sidik ragam terhadap aktivitas enzim POD menunjukkan bahwa penggenangan menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas enzim POD serta interaksi dari varietas dan zat pengatur tumbuh juga menunjukkan pengaruh nyata terhadap aktivitas enzim POD. Tabel rataan terhadap aktivitas enzim POD dapat dilihat dari Tabel 4. Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa perlakuan penggenangan diketahui bahwa P1 berbeda nyata dengan P2 dengan rataan tertinggi diperoleh pada perlakuan P1 yaitu 0,65 unit/mg/l protein. Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa interaksi rataan aktivitas enzim POD tertinggi diperoleh pada perlakuan D3K2 yaitu 1,22 unit/mg/l protein dan rataan terendah yaitu pada perlakuan D3K3 0,82 unit/mg/l protein. Perlakuan D3K2 tidak berbeda nyata dengan D2K3 tetapi berbeda nyata dengan D3K1, D2K1, D2K2 dan D3K3. Hasil pengamatan terhadap nilai enzim Superoksidas Dismutase (SOD) dan enzim Peroksidas (POD) menunjukkan bahwa perlakuan tanpa penggenangan memiliki nilai SOD dan POD yang lebih tinggi dibandingkan dengan

perlakuan yang diberi penggenangan. Suatu tanaman yang berada pada kondisi tercekam, akan mengeluarkan enzim pertahanan dari dalam tanaman itu sendiri dan memiliki nilai yang tinggi sementara dari hasil penelitian, nilai enzim SOD dan

POD yang dihasilkan memiliki nilai yang rendah. Hal ini diduga bahwa enzim tanaman yang dikeluarkan merupakan enzim lain selain SOD dan POD dimana enzim pertahanan didalam tanaman terdiri dari SOD, CAT, GR, POD, GPX, DHAR.

Tabel 3. Rataan Aktivitas Enzim SOD (unit/mg/l protein)

Perlakuan	Varietas		Rataan
	D2	D3	
...unit/mg/l protein....			
Zat Pengatur Tumbuh			
K1 (5 mg/l 2,4D)	1,14	1,04	1,66 a
K2 (10 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin)	0,67	0,72	0,69 b
K3 (15 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin)	0,59	1,01	0,80 b
Penggenangan			
P1 (Tanpa Penggenangan)	0,95	1,07	1,01 a
P2 (Penggenangan dengan MS 0 cair)	0,64	0,78	0,71 b
Rataan	0,79	0,92	0,86

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan pengaruh nyata pada uji DMRT pada taraf kepercayaan 5% pada kolom atau baris yang sama

- Varietas D2 = Gepak Kuning; Varietas D3 = Willis

Menurut literatur Pritchard et al (2000) yang menyatakan bahwa enzim antioksidan yang dibentuk oleh tanaman diantaranya adalah Glutation Peroksidase (GPX), Glutation reduktase (GR), Superoxida Dismutase (SOD), Ascorbat Peroksidase (APOD), selain itu terdapat juga enzim Katalase, Peroxidase, Dehydroascorbate Reduktase (DAR), Monodehydroascorbate Reductase (MDAR). Menurut Bosch dan Alegre (2002) sistem antioksidan di dalam sel tumbuhan menyediakan perlindungan melawan pengaruh racun dari oksigen spesies yang aktif. Komponen penting dari sistem perlindungan itu adalah pertahanan secara enzimatik, seperti SOD dan katalase yang

dapat menghindari O₂⁻ dan H₂O₂ selain metabolit seperti askorbat, glutathion dan tokoperol yang berfungsi untuk mengatur tingkat keaktifan oksigen pada jaringan tanaman. Kondisi tergenang menyebabkan terjadinya penurunan proses pertukaran gas antara jaringan tanaman dan atmosfer disekitarnya, karena gas (khususnya oksigen) berdifusi 10.000 kali lebih lambat di dalam air dibandingkan dengan di udara. Dalam hal resistensi terhadap adanya cekaman pada tanaman, aktivitas peroksidase akan meningkat pada tanaman yang terserang cekaman dan enzim ini akan membentuk suatu ketahanan internal yang dapat meningkatkan resistensi dari tanaman.

Tabel 4. Rataan Aktivitas Enzim POD (unit/mg/l protein)

Perlakuan	Varietas		Rataan
	D2	D3	
.....unit/mg/l protein.....			
Zat Pengatur Tumbuh			
K1 (5 mg/l 2,4D)	0,34 c	0,47 bc	0,41 a
K2 (10 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l kinetin)	0,25 c	1,02 a	0,64 b
K3 (15 mg/l 2,4D + 1 mg/l kinetin)	0,76 ab	0,18 c	0,47 a

Penggenangan			
P1 (Tanpa Penggenangan)	0,60	0,71	0,65 a
P2 (Penggenangan dengan MS 0 cair)	0,31	0,41	0,36 b
Rataan	0,45	0,56	0,51

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan pengaruh nyata pada uji DMRT pada taraf kepercayaan 5% pada kolom atau baris yang sama
- Varietas D2 = Gepak Kuning; Varietas D3 = Willis.

SIMPULAN

Varietas Gepak kuning dan Willis merupakan varietas yang lebih responsif terhadap pertumbuhan kalus embriogenik atas pemberian media, sedangkan varietas Baluran tidak menunjukkan aktivitas pertumbuhan. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang paling efektif dalam menginduksi kalus adalah pada pada konsentrasi K3 (15 mg/l 2,4D+ 1mg/l Kinetin). Penggenangan berpengaruh sangat nyata terhadap pertambahan bobot kalus kedelai, penurunan nilai klorofil total, penurunan aktivitas enzim Superoksidas Dismutase (SOD) dan penurunan aktivitas enzim Peroksidas (POD).

DAFTAR PUSTAKA

- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. *Plant physiology* 24 (1): 1-15.
- Bidwell, R. G. 1979. *Plant Physiology* 2nd edition. New York Macmillan Publishing.
- Bosch, M. and L. Alegre. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21 31–57.
- Dodeman, 1997. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Department of Biology Science Faculty Ege University. Turkey.
- George E.F and P.D. Sherrington. 1994. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited. England.
- Gomez, K. A. dan A. A. Gomez. 2007. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian Edisi Kedua*. UI Press. Jakarta.
- 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).
- Kemeterian Pertanian. 2015. *Pedoman teknis pengelolaan produksi kedelai tahun 2015*. Direktorat Budidaya Aneka Kacang dan Umbi. Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, Kementerian Pertanian.
- Liptan. 2000. 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*. Universitas Muhammadiyah, Purwokerto.
- Nur, D. I dan Dini, E., 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

- Ohorella, Z., 2011. Respon Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Kedelai pada Sistem Olah Tanah yang Berbeda. Universitas Al Amin Muhammadiyah Sorong, Papua Barat.
- Purnamaningsih, R dan Misky, A., 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Artemisinin dari *Artemisia annua* L. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor.
- Pritchard SG, Ju Z, Santen EV, Qiu J, Weaver DB, Prior SA, and Roger H. 2000. *The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes.* *Aust J Plant Physiol* 27:1061-106
- Sitompul, S dan Guritno. B. 1995. Analisis Pertumbuhan Tanaman. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sugiyarto dan A. G. Paramita. 2014. Persyaratan Tumbuh dan Wilayah Produksi Kedelai di Indonesia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. Suprpto, H.S. 2001. Bertanam Kedelai. Jakarta.
- Suriadikarta dan A. G. Satria. 2007. Persyaratan Tumbuh dan Wilayah Produksi Kedelai di Indonesia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.
- Suwignyo, R.A. 2007. Ketahanan Tanaman Padi terhadap Kondisi Terendam: Pemahaman terhadap Karakter Fisiologis untuk Mendapatkan Kultivar Padi yang Toleran di Lahan Rawa Lebak. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Wattimena, E. S., S. R. Branch, D. Chamberlain, H. Gabe, M. S. Wright, and C. N. Stewart Jr. 1992. Screening of soybean, *Glycine Max* (L.) Merrill, Lines for Somatic Embryo Induction and Maturity Capability from Immature Cotyledons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38: 543-548.