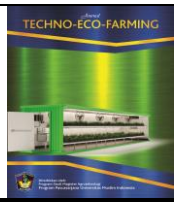
Journal Techno Eco Farming (JTEF)
Volume 2, Nomor 1, Mei 2022
Website: http: pasca-umi.ac.id/index.php/jaf
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



KETAHANAN KALUS EMBRIO KEDELAI (*Glycine max* L) TERHADAP TEKANAN SALINITAS (NaCl) SECARA IN VITRO

Maulana Wulandari[1], Abdullah[2], Netty[3]
[1]*Mahasiswa Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Muslim Indonesia*
[2,3]*Donsen Universitas Muslim Indonesia*
[1]*maulanawulandari3@gmail.com*

ABSTRAK

Pengembangan tanaman kedelai daya adaptif terhadap salinitas tinggi dapat dilakukan melalui pendekatan bioteknologi (kultur jaringan). Sifat daya adaptif tanaman kedelai dapat dilakukan melalui induksi keragaman somaklonal dengan pemberian tekanan seleksi hingga batas toleransinya. induksi keragaman somaklonal secara in vitro sangat ditentukan oleh daya regenerasi jaringan yang digunakan sebagai sumber eksplan. Keragaman somaklonal dapat diseleksi dan dikembangkan untuk menghasilkan tanaman baru yang lebih adaptif terhadap kondisi salinitas tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan formulasi media kultur untuk regenerasi kalus embrio kedelai dan menganalisa daya toleran terhadap cekaman salinitas (NaCl) secara In Vitro. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur jaringan Bio-sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian ini terdiri dari dua tahap menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola. Tahap I: studi media daya regenerasi eksplan kedelai secara in vitro dalam media MS dengan perlakuan zat pengatur tumbuh BAP yang terdiri dari empat taraf 0,0 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm dan 2,0 ppm) dan 2,4-D (8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm). Parameter pengamatan waktu pembentukan kalus (hst), eksplan membentuk kalus (%), berat basah kalus (g), struktur dan warna kalus. Tahap II: daya toleransi kalus kedelai terhadap cekaman salinitas dalam media mengandung NaCl (0,0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%). Parameter pengamatan jumlah kalus hidup, berat basah kalus (g) dan ketahanan kalus. Hasil penelitian menunjukkan media dasar regenerasi kalus embrio kedelai dapat ditambahkan 1,0 ppm BAP dan 8 ppm 2,4-D yang menghasilkan berat basah kalus tertinggi. Tingkat ketahanan kalus dalam kategori toleran pada media NaCl 0,5% dan pada media NaCl 1,0% dalam kategori tahan. Lebih Lanjut, konsentrasi NaCl yang tinggi dapat menyebabkan pencoklatan dan nekrosis pada konsentrasi 1,5%.

Kata kunci: BAP, 2,4-D, embrio kedelai, kalus, salinitas, in vitro.

ABSTRACT

The development of adaptive soybean plants to high salinity can be done through a biotechnology approach (tissue culture). The adaptive capacity of soybeans can be done through the induction of somaclonal diversity by applying selection pressure to the tolerance limit. The induction of somaclonal diversity in vitro is largely determined by the regeneration capacity of the tissue used as a source of explants. Somaclonal diversity can be selected and developed to produce new plants that are more adaptive to certain salinity conditions. This study aimed to determine the formulation of culture media for callus regeneration of soybean embryos and to analyze the tolerance to salinity (NaCl) stress by In Vitro. The research was carried out at the Bio-science and Plant Reproductive Biotechnology Laboratory, Department of Agricultural Cultivation, Faculty of Agriculture, Hasanuddin University, Makassar. This study consisted of two stages using a completely randomized design. Phase I: study of the in vitro regeneration power of soybean explants in MS media with the treatment of growth regulators BAP (0.0 ppm, 1.0 ppm, 1.5 ppm and 2.0 ppm) and 2,4-D (8 ppm, 10 ppm, 12 ppm and 14 ppm). Parameters observed were callus formation time (hst), explants formed callus (%), callus wet weight (g), callus structure and color. Phase II: soybean callus tolerance to salinity stress in media containing NaCl (0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%). Parameters observed were the number of live callus, callus wet weight (g) and callus resistance. The results showed that the basic media for soybean embryo callus regeneration could be added with 1.0 ppm BAP and 8 ppm 2,4-D which resulted in the highest callus wet weight. The callus resistance level was in the tolerance category on 0.5% NaCl media and on 1.0% NaCl media in the resistant category.More ever, high NaCl concentration can cause browning and necrosis at 1.5% NaCl concentration.

Keywords: BAP, 2,4-D, soybean embryo, callus, salinity, in vitro.

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan komoditas pangan yang sangat penting karena mengandung banyak protein dan minyak nabati. Selain itu, juga mengandung mineral lebih tinggi seperti kalsium, fosfor, besi, potassium dan magnesium dibandingkan tanaman serealia. Menurut Zaheer dan Akhtar (2017) pada biji kedelai terdapat senyawa isoflavon yang termasuk dalam kelompok flavonoid dan dapat berfungsi sebagai antioksidan alami.

Pemanfaatan utamanya dari biji sebagai bahan pangan dan minyak serta bahan industri lainnya. Peran kedelai yang cukup besar menyebabkan permintaan biji kedelai terus meningkat sehingga perlu dilakukan pengembangan dan peningkatan produksi. Pengembangan tanaman kedelai di lahan tegalan dan sawah terbatas sehingga sulit untuk meningkatkan produksi tanaman kedelai. Disisi lain, lahan pesisir potensial untuk dikembangkan namun terkendala oleh kadar salinitas yang tinggi.

Indonesia sebagai negara kepulauan memiliki potensi lahan pesisir (tanah salin) yang sangar luas dan diperkirakan lahan pesisir (dekat pantai) yang mengalami salinitas seluas 12,020 juta ha atau 6,20% dari total daratan Indonesia Karolinoerita dan Yusuf, (2020) dan dalam setahun mendapat intrusi air laut lebih dari tiga bulan dengan kandungan Na dalam larutan antara 8 – 15% Noor, 1996 *dalam* Asmuni dkk, (2017). Hal ini menjadi kendala utama dalam pemanfaatan lahan pesisir untuk budidaya tanaman pertanian

Pemanfaatan lahan pesisir untuk pertanian perlu dikembangkan varietas/jenis tanaman yang memiliki ketahanan terhadap kondisi lahan dengan salinitas yang lebih tinggi. Tanah salin dapat menyebabkan terjadinya stress abiotik utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan menentukan produksi tanaman. Umumnya tanah salin didefinisikan sebagai tanah dimana konduktivitas listrik (EC) dari ekstrak jenuh (ECe) di zona akar melebihi 4 dS m-1 (sekitar 40 mM NaCl) pada 25°C dan memiliki natrium yang dapat ditukar sebesar 15 % Hameda El Sayyed, (2011).
Pengembangan tanaman kedelai daya adaptif terhadap salinitas tinggi dapat dilakukan melalui pendekatan bioteknologi (kultur jaringan). Sifat daya adaptif tanaman kedelai dapat dilakukan melalui induksi keragaman somaklonal dengan pemberian tekanan seleksi hingga batas toleransinya. Keragaman somaklonal dapat diseleksi dan dikembangkan untuk menghasilkan tanaman baru yang lebih adaptif terhadap kondisi salinitas tertentu. Muller *et al.* (1990) mengatakan bahwa variasi somaklonal pada tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan (*in vitro)* dapat digunakan untuk meregenerasikan kultivar baru.

Metode somaklonal lebih efektif dan efisien karena perubahan dapat diarahkan pada perubahan sifat sesuai yang diinginkan dengan penambahan komponen seleksi ke dalam media. Pengujian ketahanan terhadap salinitas dapat menggunakan NaCl dalam media kultur. Hal demikian digunakan pada tanaman tebu Soeparjono, (2014), jagung Finariyah, (2015) dan padi Yunita, (2018). Induksi keragaman somaklonal telah dilakukan oleh Manurung, dkk (2018) pada kedelai varietas Gepak Kuning dengan kombinasi 10 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l BAP menghasilkan penampilan dan berat kalus tertinggi. Ayuningrum dkk (2015) menggunakan kombinasi 2,4-D 10 ppm dan BAP 2 ppm dan menunjukkan hasil terbaik terhadap

persentase kalus dan tipe kalus kedelai. Hal yang sama juga dilakukan oleh Shofianita dkk (2013) menyatakan bahwa penambahan1% NaCl menyebabkan kematian hingga 91,67% pada varietas tebu yang digunakan.

Penelitian untuk ketenggangan salinitas yang dilakukan oleh Soeparjono (2014) menunjukkan bahwa penambahan NaCl ke dalam media sebanyak 3 g/l menunjukkan pengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan keragaman kalus tebu. Hal yang sama juga dilakukan oleh Shofianita dkk (2013) menyatakan bahwa penambahan 1% NaCl menyebabkan kematian hingga 91,67% pada varietas tebu yang digunakan.
Berdasarkan informasi hasil penelitian tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengetahui ketahanan kalus embrio kedelai terhadap tekanan salinitas (NaCl) secara *in vitro.*

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap yang saling berkesinambungan di Laboratorium Kultur Jaringan Bio-sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya pertanian, Fakultas Pertanian, Hasanuddin University (UNHAS), Makassar.

Media dasar penelitian ini menggunakan media dasar MS (Murashige and Skoog). Bahan yang adalah embrio kedelai, BAP, 2,4-D, agar, gula pasir, NaCl, aquadest steril, alkohol 70% dan 96%, NaOH 1 N, HCl 0,1 N, detergen, spiritus, NaCIO (Bayclin), dithane dan betadine. Alat yang digunakan adalah autoklaf, *magnetic stirrer*, gelas ukur, pipet, gelas beker, timbangan analitik, pH meter, botol kultur, tutup botol, *laminar air flow cabinet*, bunsen, pinset, scalpel, blade, cawan petri, plastik wrap, *hand sprayer* dan rak kultur.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Tahap pertama studi daya regenerasi kalus embrio kedelai terdiri atas dua faktor. Faktor pertama, hormon tumbuh BAP terdiri atas empat taraf, yaitu: 0 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm, 2,0 ppm. Faktor kedua, hormon tumbuh 2,4-D terdiri atas empat taraf, yaitu: 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm. Dari kedua faktor tersebut diperoleh 16 kombinasi dan diulang 4 kali dengan parameter pengamatan yaitu:

1. Waktu pembentukan kalus (hst) diamati selama periode waktu yang ditentukan terbentuknya kalus yang diamati selama masa inkubasi.
2. Persentase eksplan membentuk kalus (%) diamati pada akhir penelitian dengan rumus sebagai berikut:

   % eksplan membentuk kalus = $\frac{\sum \text{Kalus yang terbentuk}}{\sum \text{Eksplan yang ditanam}}$ x 100%
3. Berat basah kalus (g) diamati pada awal dan akhir penelitian. Pada awal penelitian dilakukan penimbangan setelah penanaman eksplan pada media dan pada pengamatan terakhir dilakukan dengan menimbang botol kultur yang berisi kalus

   Berat Kalus = berat akhir – berat
4. Struktur kalus diamati secara deskriptif atas kalus remah dan kompak dan warna kalus diamati secara deskriptif berdasarkan skoring yang digunakan oleh Kadir (2006).

Tabel 1. Deskripsi Struktur Kalus

Deskripsi	Keterangan
Remah	Tekstur lunak, tersusun dari sel-sel renggang, mudah dipisah dan mengandung sedikit air
Kompak	Tekstur keras dan padat, tersusun dari sel-sel kecil yang rapat, susah dipisah dan mengandung banyak air

(Sumber : Sugiarto dan Paramita, 2014)

Tabel 2. Deskripsi Warna Kalus

Skor	Deskripsi	Keterangan
7	Hijau	h
6	Hijau Kekuningan	h/k
5	Putih	p/ph
4	Putih kekuningan	p/k
3	Kuning kecoklatan	k/c
2	Coklat kehitaman	c/h
1 dan 0	Hitam atau mati	h/m

Sumber : *Kadir, 2006.*

Tahap kedua pengujian ketahanan kalus embrio kedelai dalam beberapa tingkat salinitas (NaCl). Kalus yang dihasilkan dari kombinasi BAP dan 2,4-D yang terbaik tahap pertama disubkultur dan diberikan cekaman salinitas (NaCl). Media subkultur yang digunakan adalah media terbaik dari percobaan dan kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D. Perlakuan salinitas (NaCl) terdiri dari lima taraf yaitu : 0%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% dan diulang 9 kali dengan parameter pengamatan meliputi:

1. Daya hidup kalus dan berat basah kalus (g). Pengamatan daya hidup kalus diamati pada akhir pengamatan dengan rumus (Ubudiyah dan Nurhidayanti, 2013):

   $$\% \text{ Kalus hidup} = \frac{\sum \text{Kalus yang toleran}}{\sum \text{Kalus yang diinokulasi}} \times 100\%$$

   Berat basah kalus diamati pada awal dan akhir penelitian. Pada awal penelitian dilakukan penimbangan setelah penanaman eksplan pada media dan pada pengamatan terakhir dilakukan dengan menimbang botol kultur yang berisi kalus. Berat basah kalus dihitung dengan rumus :

   Berat Kalus = selisih berat awal dan berat

2. Daya toleransi kalus yang diamati secara visual berdasarkan pada range penilaian sebagai berikut :

Tabel 3. Deskripsi Ketahanan Kalus

Skor	Deskripsi	Keterangan
1	Mati, Kalus berwarna coklat seluruhnya	Sangat peka
3	Berair, lebih dari 75% kalus berwarna coklat	Peka
5	Berwarna kuning kecoklatan dengan permukaan licin	Tahan
7	Berwarna kuning-kuning pucat, kalus remah (*friable*)	Toleran
9	Berwarna kuning-kuning pucat, kalus sehat bersifat nodular dan remah (*friable*)	Sangat toleran

Sumber : *Ubudiyah dan Nurhidayanti, 2013 ; Lisdyayanti dkk, 2019 ; dan Hidayah, 2020).*

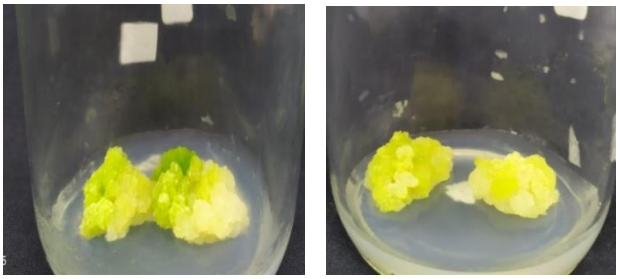
Data penelitian yang diperoleh dianalisis dengan Anova, BNJ dan analisis regresi dengan menggunakan excel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Studi daya regenerasi kalus eksplan embrio kedelai

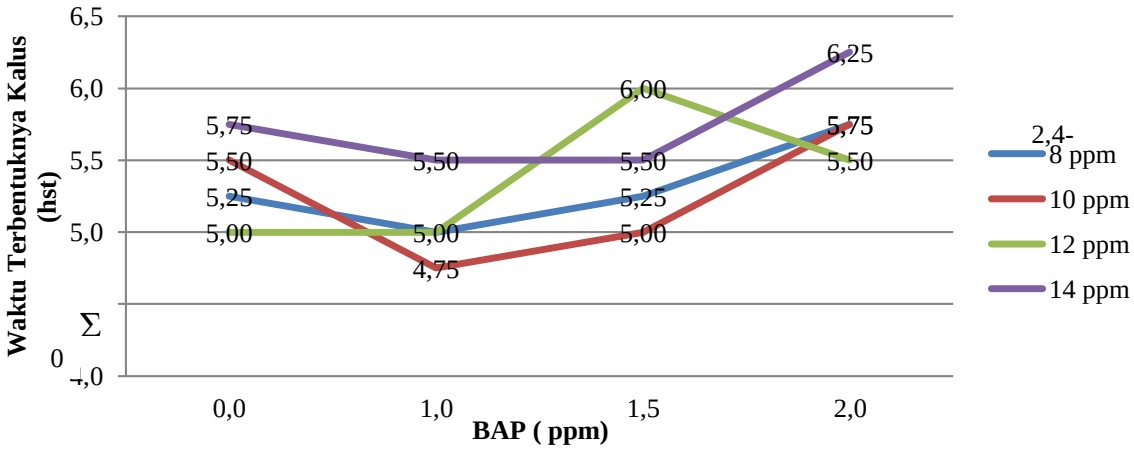
a. Waktu pembentukan kalus

Hasil pengamatan rata-rata waktu terbentuknya kalus dari eksplan embrio kedelai yang ditanam dalam media dasar MS dengan penambahan berbagai konsentrasi hormon tumbuh BAP dan 2,4-D menunjukkan pengaruh tidak signifikan. Waktu munculnya kalus (hst) pada berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh (BAP dan 2,4-D) dalam media dasar MS (Gambar 2) berbeda satu dengan lainnya Namun demikian, pola respon waktu terbentuknya kalus cenderung lebih cepat (4,75 hst) pada perlakuan BAP 1,0 ppm dan 2,4-D 10 ppm dan waktu pembentukan kalus paling lama (6,25 hst) pada perlakuan BAP 2,0 ppm dan 2,4-D 14 ppm (Gambar 1).



a b

Gambar 1. *a. Kalus yang terbentuk lebih cepat (4,75 hst) ; b. Kalus yang terbentuk paling lama (6,25 hst)*



Gambar 2. *Rata-rata Waktu Munculnya Kalus (hst) pada Eksplan Embrio Kedelai dari Berbagai Kombinasi BAP dan 2,4-D yang Diinduksi secara In Vitro*

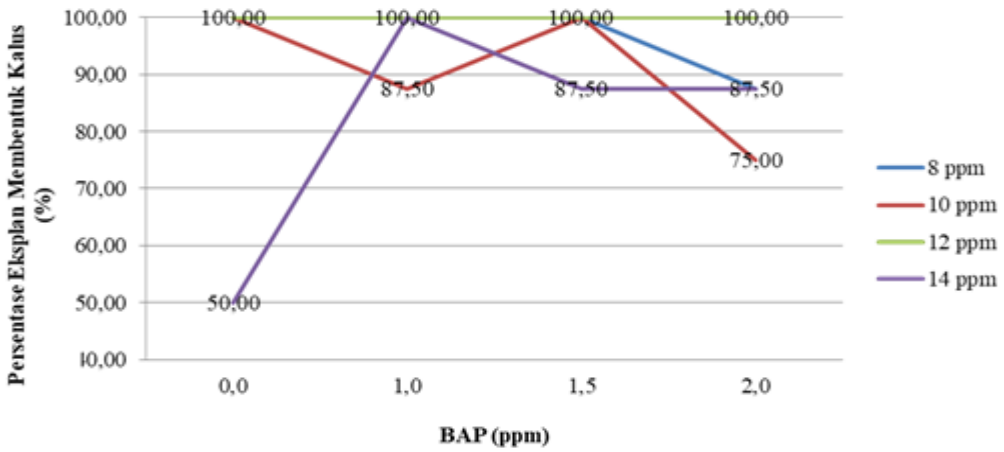
Penambahan BAP dalam media kultur dapat berpengaruh terhadap waktu pembentukan kalus karena sifat mudah ditranslokasikan, aktif merangsang pertumbuhan kalus, serta aktif dalam meregenerasi kalus maupun tunas Wiendi *et al.*, 1991 *dalam* Ayuningrum, (2015). Mayerni dkk (2020) pada tanaman nilam lokal, menunjukkan rata- rata waktu pembentukan kalus yang lebih cepat (8,0 hst) melalui penambahan 1,0 mg/l BAP. Dalam penelitian ini penambahan BAP menunjukkan kecenderungan waktu pembentukan kalus lebih cepat yaitu dengan penambahan 1,0 ppm BAP dan semakin tinggi konsentrasi BAP maka pembentukan kalus semakin lama.

Penambahan 2,4-D dalam media dengan konsentrasi yang rendah dapat mendorong pembelahan sel, mendorong pertumbuhan tanaman dan meningkatkan daya kecambah benih Wattimena, (2001). Sejalan dengan pernyataan Syahid dan Hernani (2001), bahwa penambahan 2,4-D mampu merangsang pembentukan kalus. Pada penelitian ini waktu pembentukan kalus yang cenderung lebih cepat pada penambahan 2,4-D ke dalam media. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Widoretno *et al*. (2003), yaitu penambahan hormon 2,4-D dengan konsentrasi 10 ppm cukup baik untuk menginduksi kalus. Perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh tersebut juga memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus Gunawan, (1982).

Pembentukan kalus ditandai dengan pembengkakan dan berwarna putih disekitar permukaan eksplan (Xu, 2018) dan kandungan zat pengatur tumbuh dalam media kultur akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan Setyaningrum, (2011). Pada penelitian ini, kombinasi perlakuan hormon tumbuh yang terbaik yaitu 1,0 ppm BAP dan 10 ppm 2,4-D menunjukkan waktu pembentukan kalus lebih cepat (4,75 hst). Hal ini sesuai dengan pernyataan Robles-Martinez *et al*. (2016) bahwa penambahan 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus, menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan terjadinya pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein dan plastisitas, serta pengembangan dinding sel. Pemberian sitokinin konsentrasi rendah yang mengandung auksin dapat membantu pembentukan kalus Wattimena, (1988).

b. Persentase eksplan membentuk kalus (%)

Hasil pengamatan persentase eksplan membentuk kalus dengan penambahan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D disajikan dalam gambar 3. Kombinasi BAP dan 2,4-D menunjukkan persentase eksplan membentuk kalus sebanyak 100% yaitu dengan penambahan 12 ppm 2,4 D pada berbagai konsentrasi BAP yang digunakan. Persentase eksplan membentuk kalus yang terendah (50%) ditunjukkan perlakuan 0,0 ppm BAP dan 14 ppm 2,4-D. Penambahan BAP 1,0 ppm dan 2,4-D 10 ppm persentase eksplan membentuk kalus 87,5%. Sedangkan BAP 2,0 ppm dan pada semua taraf 2,4-D yang ditambahkan menunjukkan eksplan membentuk kalus lebih rendah.



Gambar 3. *Persentase Eksplan Membentuk Kalus (%) pada Berbagai Kombinasi BAP dan 2,4-D yang Diinduksi secara In Vitro*

Secara tunggal 2,4-D dapat menghambat pembentukan kalus, namun jika diiringi dengan pemberian BAP maka dapat memperbaiki daya tumbuh kalus. Pemberian BAP dan 2,4-D pada berbagai kombinasi dapat membentuk kalus pada eksplan embrio kedelai. Auksin dan sitokinin yang cukup dan seimbang dibutuhkan dalam kultur *in vitro* karena auksin seperti 2,4-D dapat meningkatkan daya aktifitas dalam memacu pembelahan sel. Pemberian sitokinin konsentrasi rendah dalam media yang mengandung auksin dapat membantu pembentukan kalus Wattimena, (1988).

Persentase eksplan yang membentuk kalus berkaitan dengan waktu munculnya kalus dimana semakin cepat waktu munculnya kalus pada eksplan, maka persentase eksplan yang membentuk kalus juga semakin besar Fauziyyah dkk, (2012).

c. Berat basah kalus (g)

Hasil pengamatan berat basah kalus pada embrio kedelai yang ditanam dalam media dasar MS dengan penambahan BAP dan 2,4-D menunjukkan pengaruh interaksi antara BAP dan 2,4-D menunjukkan pengaruh yang nyata dengan rata-rata berat basah kalus tertinggi (3,64 g) dari kombinasi BAP 1,0 ppm dan 2,4-D 8 ppm dan rata-rata berat kalus terendah (1,14 g) dari kombinasi BAP 0 ppm dan 2,4-D 14 ppm (Tabel 4).

Tabel 4. Rata-rata Berat Basah Kalus (g) pada Berbagai Kombinasi BAP dan 2,4-D yang Diinduksi secara *In Vitro.*

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)				Rata-rata
	8	10	12	14	
0,0	$3,45^{a}{}_{x}$	$2,76^{a}{}_{xy}$	$2,80^{a}{}_{xy}$	$\mathbf{1,14}^{b}{}_{y}$	2,53
1,0	$\mathbf{3,64}^{a}{}_{x}$	$3,53^{a}{}_{x}$	$3,53^{a}{}_{x}$	$3,36^{a}{}_{x}$	3,51
1,5	$2,99^{a}{}_{x}$	$2,88^{a}{}_{x}$	$2,55^{a}{}_{x}$	$3,44^{a}{}_{x}$	2,96
2,0	$3,39^{a}{}_{x}$	$2,47^{a}{}_{x}$	$3,17^{a}{}_{x}$	$3,00^{ab}{}_{x}$	3,01
Rata-rata	3,37	2,91	3,01	2,74	

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama (a, b) dan baris yang sama (x, y) berarti berbeda nyata pada taraf uji BNJ 1% dengan nilai pembanding = 1,99.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam pembentukan kalus embrio dibutuhkan konsentrasi 2,4-D lebih tinggi (8 ppm) dibandingkan BAP (1,0 ppm). Hal yang sama pada penelitian yang dilakukan oleh Arsyam (2020) dimana berat kalus tertinggi (3,35 g) dari konsentrasi 4-D (8 ppm) yang lebih tinggi dibandingkan BAP (1 ppm).

Dodds dan Roberts (1984) menyatakan bahwa pertumbuhan kalus embriogenik membutuhkan auksin dengan konsentrasi tinggi dan sitokinin yang rendah. Selain itu semakin tinggi konsentrasi 2,4-D maka berat kalus semakin rendah.

Rahayu dkk (2003) menyatakan bahwa kandungan air yang tinggi menyebabkan berat basah kalus yang lebih besar. Selain itu, Indria dkk (2017) menyatakan bahwa kalus yang besar memiliki berat kalus yang lebih berat karena terjadinya pembelahan sel yang mengakibatkan bertambahnya jumlah sel pada kalus tersebut.

d. Struktur kalus

Pengamatan struktur kalus embrio kedelai dilakukan secara deskriptif yang didasarkan atas remah dan kompak. Sugiarto dan Paramita (2014) mengemukakan bahwa ciri kalus remah yaitu tekstur lunak, mudah dipisah dan mengandung sedikit air. Sedangkan ciri kalus kompak yaitu tekstur keras, susah dipisah dan

mengandung banyak air Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa struktur kalus yang terbentuk umumnya bersifat remah pada semua kombinasi perlakuan BAP dan 2,4-D yang dicobakan.

e. Warna kalus

Hasil pengamatan warna kalus dilakukan melalui skoring warna sebagaimana digunakan Kadir (2006) sebagai berikut : hijau (7), hijau kekuningan (6), putih (5), putih kekuningan (4), kuning kecoklatan (3), coklat kehitaman (2), Hitam atau mati (1 dan 0). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai skoring warna kalus dari berbagai perlakuan BAP dan 2,4-D berpengaruh secara tunggal (Tabel 5).

Warna kalus yang terbentuk diamati pada akhir pengamatan dengan menggunakan skoring warna kalus. Skoring warna kalus dilihat menggunakan 7 kategori yang dimulai dari skor 7 hingga 1 yaitu hijau, hijau kekuningan, putih, putih kekuningan, kuning kecoklatan, coklat kehitaman dan hitam. Kalus akan tetap berwarna putih jika terus membelah dan jika tidak terjadi pembengkakan, kalus akan berubah menjadi cokelat muda, cokelat atau cokelat tua. Menurut Kresnawati, (2006), warna kalus yang bermacam-macam dipengaruhi oleh diakibatkan pigmentasi cahaya dan asal eksplan. Pigmentasi bisa merata keseluruh permukaan kalus atau hanya sebagian saja. Hanifah (2007), warna kalus hijau keputihan ditunjukkan pada perlakuan BAP 1 ppm, penambahan sitokinin pada taraf yang sesuai cenderung menunjukkan warna hijau (cerah) pada kalus lebih tahan lama.

Pada berbagai perlakuan BAP dan 2,4-D berbeda tidak nyata antara satu dengan lainnya. Rata-rata skoring kalus tertinggi perlakuan BAP 1,5 ppm dengan nilai = 5,75 dan termasuk kategori warna kalus putih dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Sedangkan pada perlakuan 2,4-D 8 ppm dengan nilai = 6,06 dan termasuk kategori warna kalus hijau kekuningan dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Secara umum berbagai kombinasi BAP dan 2,4-D yang menunjukkan rata-rata skoring warna kalus tertinggi yaitu 6,25 dengan kombinasi perlakuan BAP 1,5 ppm dan 2,4-D 10 ppm dan warna kalus hijau kekuningan (Tabel 5)

Berdasarkan warna kalus yang dominan pada penelitian ini dapat dikatakan kualitas kalus cukup baik. Hal ini sesuai dengan penelitian Hanifah (2007), warna kalus hijau keputihan ditunjukkan pada perlakuan BAP 1 ppm, penambahan sitokinin pada taraf yang sesuai cenderung menunjukkan warna hijau (cerah) pada kalus lebih tahan lama.

Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan. Semakin hijau warna kalus maka semakin banyak pula kandungan klorofilnya Fatmawati, (2008 *dalam* Andaryani, 2010) dan menunjukkan daya hidup kalus lebih baik. Sebaliknya jika kekurangan klorofil maka kalus akan transparan atau berwarna putih yang mengindikasikan kekurangan klorofil dan dapat mengakibatkan penghambatan pertumbuhan kalus. Abdullah dkk. (1998) dalam Suskendriyati dkk. (2003), menyatakan bahwa sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Mahadi *et al.* (2014) warna kalus dapat memperlihatkan baik tidaknya pertumbuhan kalus, pigmen putih dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik.

Tabel 5. Rata-rata Skoring Warna Kalus pada Berbagai Kombinasi BAP dan 2,4-D yang Diinduksi secara *In Vitro.*

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)				Rata-rata
	8	10	12	14	
0,0	6,00	4,75	5,00	2,50	4,56[b]
1,0	5,50	4,50	4,50	4,75	4,81[b]
1,5	6,00	6,25	6,00	4,75	5,75[a]
2,0	5,75	4,00	5,00	4,25	4,75[b]
Rata-rata	6,06[a]	4,86[b]	5,13[b]	4,06[c]	

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama (a,b) berarti berbeda nyata pada taraf uji BNJ 1% dengan nilai pembanding = 0,53 ; Hijau = 7,0 > ; Hijau Kekuningan = 6,0 – 6,9 ; Putih = 5,0 – 5,9 ; Putih Kekuningan = 4,0 – 4,9 ; Kuning Kecokelatan = 3,0 – 3,9 ; Cokelat Kehitaman = 2,0 – 2,9 ; Hitam atau Mati = 0,0 – 1,9.

2. Ketahanan kalus terhadap salinitas

a. Daya hidup dan Berat Kalus

Pengamatan daya hidup kalus dari berbagai konsentrasi NaCl disajikan pada Tabel 3. Hasil pengamatan daya hidup kalus dari berbagai tekanan konsentrasi NaCl menunjukkan persentase daya tahan hidup kalus yang semakin menurun setiap peningkatan kadar NaCl dalam media. Demikian halnya berat kalus yang dihasilkan (Gambar 3). Daya adaptasi kalus pada tekanan NaCl yaitu kalus masih dapat bertahan (100%) hingga tekanan salinitas NaCl 0,5% dan daya hidup kalus menurun hingga 22,22% pada tekanan salinitas 1,0%. Selanjutnya setiap peningkatan kadar salinitas mengakibatkan kematian kalus (Tabel 3). Penekanan pertumbuhan merupakan suatu fenomena umum yang terjadi pada tanaman yang mengalami stress garam, termasuk kultur sel, jaringan, organ tumbuhan yang ditumbuhkan dalam media yang ditambahkan NaCl. Stres yang diakibatkan oleh kadar salinitas dihasilkan dari adanya rasio K^+/Na^+ yang dihasilkan oleh konsentrasi Na^+ dan Cl^- (Chamoli, 2021). Cekaman salinitas pada konsentrasi tertentu dapat menyebabkan terhalangnya penyerapan hara dan air yang menyebabkan pertumbuhan abnormal atau lambat Pessarakli, (1991) dan cekaman akan memungkinkan tanaman memberikan respon yang ditunjukkan dengan daya hidup kalus hidup Shilpi dan Narendra, (2005).

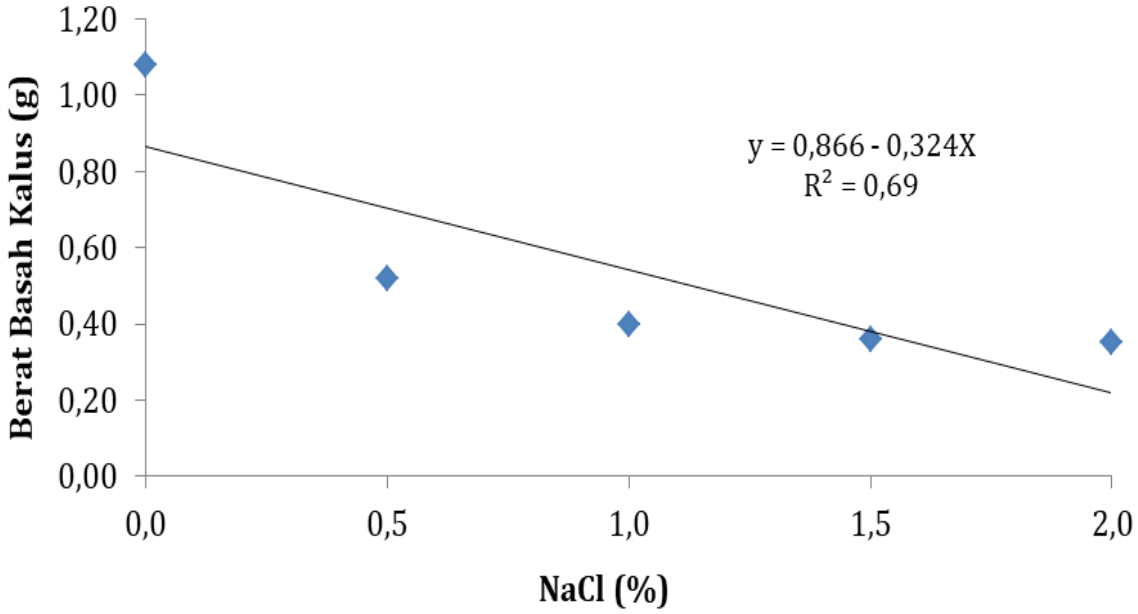
Tabel 6. Daya Hidup Kalus dari Berbagai Konsentrasi NaCl yang Diinduksi secara *In Vitro*

Konsentrasi NaCl	Daya Hidup Kalus
0,0%	100,00%
0,5%	100,00%
1,0%	22,22%
1,5%	0,00%(*)
2,0%	0,00%(*)

Keterangan : (*) = kalus mati (kecokelatan).

Hasil pengamatan berat basah kalus (g) dari berbagai tekanan salinitas (NaCl) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap berat kalus. Berat kalus yang dihasilkan menurun seiring dengan peningkatan tekanan salinitas yang diberikan. Hubungan peningkatan kadar salinitas dan berat kalus dapat digambarkan dengan persamaan regresinya y = 0,866 – 0,324X (Gambar 3). Hal yang sama ditemukan oleh Fathin dan Triono (2015) bahwa cekaman salinitas mampu menurunkan berat kalus jagung varietas Manding hingga 83%.

Penekanan pertumbuhan merupakan fenomena umum yang terjadi ketika tanaman diberi cekaman salinitas. Untuk bertahan hidup pada kondisi cekaman maka energi metabolisme yang digunakan lebih banyak daripada kondisi tanpa cekaman Yunita dkk, (2014) dan berdampak pada penurunan massa sel Babu, (2007). Cekaman NaCl juga dapat mengakibatkan hilangnya turgor sel akibat berkurangnya potensial air di dalam sel.



Gambar 4. Regresi Linier Berat Basah Kalus dari Berbagai Tekanan Seleksi Salinitas (NaCl)

Terjadi penurunan rata-rata massa kalus dikarenakan kalus yang terdapat pada medium dengan konsentrasi NaCl tinggi mengalami cekaman salinitas, seperti terjadinya ketidakseimbangan penyerapan air dan hara, penghambatan metabolisme akibat gangguan ketidakseimbangan ion dan efek osmotik, sehingga kalus membutuhkan energi lebih untuk melakukan metabolisme dan berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhannya. Babu, *et al* (2007) menyatakan bahwa sel yang terpapar oleh cekaman salinitas (NaCl) akan menghabiskan lebih banyak energi metabolismenya daripada pada kondisi tanpa cekaman salinitas (NaCl), sehingga energi yang dihasilkan lebih banyak digunakan untuk mengatur penyesuaian osmotik dan berdampak pada penurunan massa sel dan berdampak pada pengurangan rata-rata massa sel pada konsentrasi NaCl yang semakin tinggi.

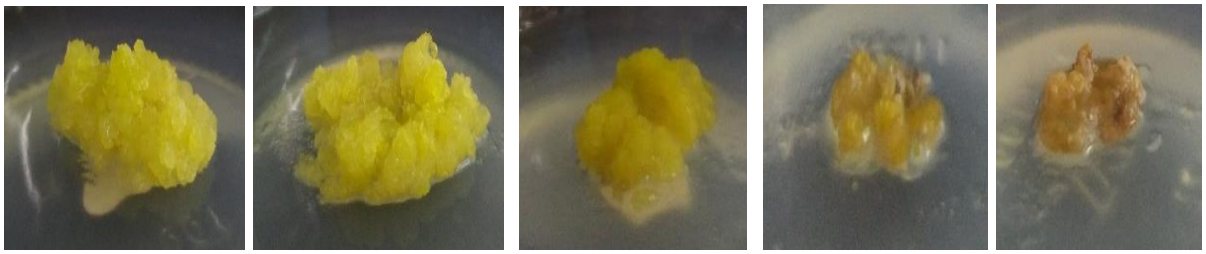
b. Daya toleransi kalus

Hasil daya toleransi kalus dianalisis berdasarkan skoring ketahanan kalus (Ubudiyah dan Tutik, 2013) dikategorikan sebagai berikut: sangat peka (kalus mati dan berwarna cokelat seluruhnya) = 1, peka (kalus berair dan 75% berwarna cokelat) = 3, tahan (kalus kuning kecokelatan dan permukaan licin) = 5, toleran (kalus kuning pucat dan remah) = 7, sangat toleran (kalus kuning-kuning pucat, sehat dan remah) = 9.

Tabel 7. Ketahanan Kalus dari Berbagai Konsentrasi NaCl yang Diinduksi secara *In Vitro*

Konsentrasi NaCl	Rata-rata skoring	Keterangan
0,0%	9,00	Kontrol
0,5%	8,78	Toleran
1,0%	5,44	Tahan
1,5%	1,00	Sangat Peka
2,0%	1,00	Sangat Peka
Total	25,22	

Keterangan : Sangat toleran = 9,0 > ; Toleran = 7,0 – 8,9 ; Tahan = 5,0 – 6,9 ; Peka = 3,0 - 4,9 ; Sangat Peka = 1,0 - 2,9.



a b c d e

Gambar 5. Warna Kalus Embrio Kedelai pada Tekanan Seleksi Salinitas (NaCl) a. 0,0% ; b. 0,5% ; c. 1,0% ;d. 1,5% ; e. 2,0%.

Berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa salinitas (NaCl) berpengaruh nyata terhadap daya toleransi kalus melalui perubahan warna kalus. Peningkatan salinitas media hingga 0,5% NaCl menunjukkan daya toleransi kalus masih tinggi (skor 8,78) dalam kategori toleran dan selanjutnya daya tahan kalus menurun pada pada peningkatan kadar 1,0% NaCl (skor 5,44) dalam kategori tahan. Peningkatan kadar NaCl hingga 2,0%, kalus mengalami kematian atau sangat peka (Tabel 7 dan Gambar 5). Ketahanan kalus ditandai dengan warna kalus. Semakin meningkat konsentrasi NaCl maka warna kalus juga berubah menjadi cokelat kehitaman. Menurut Bariyyah (2015) degradasi warna dapat dijadikan sebagai indikator dalam proses seleksi genotipe yang tahan terhadap cekaman salinitas. Kalus yang mengalami cekaman NaCl menyebabkan terjadi ketidakseimbangan penyerapan air dan hara, sehingga terjadi penghambatan metabolisme akibat hilangnya turgor sel dan rendahnya potensial air di dalam sel El Sayyed, (2011). Selain itu, kelebihan Na^+ dan Cl^- dalam ekstraseluler menghambat asimilasi nitrogen yang sangat penting bagi pertumbuhan sel dan tanaman (Yuniati, 2004). Menurut Soeparjono (1983), kalus yang tahan terhadap cekaman salinitas tinggi adalah kalus yang mempunyai warna putih kekuningan dan stuktur remah. Sebaliknya kalus yang tidak tahan terhadap salinitas tinggi mempunyai warna hitam dan berstuktur lengket. Hasil penelitian Ubudiyah dan Nurhidayati (2013) kalus yang mati pada media salin menandakan bahwa kalus tanaman tersebut sangat peka terhadap cekaman salinitas.

Salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya perubahan warna kalus yaitu adanya kadar NaCl sehingga warna pada kalus menjadi coklat atau hitam (mati) yang menunjukkan adanya kematian sel-sel kalus. Menurut Widyawanti (2010), pertumbuhan kalus yang semakin menurun ditandai dengan warna kalus yang semakin gelap (kecoklatan). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

Farid dkk (2006), menyatakan bahwa dengan adanya molekul NaCl yang mengalami ionisasi menjadi Na^+ dan Cl^- mengakibatkan terjadi peningkatan salinitas dalam media yang menginduksi terjadinya cekaman ion dan sehingga terjadi kematian kalus.

KESIMPULAN

Induksi kalus dari eksplan embrio kedelai dapat berlangsung dengan baik dalam media MS (Murashige and Skoog) dengan suplemen hormon tumbuh BAP 1,0 ppm dan 2,4-D 8 ppm.

Tingkat ketahanan kalus eksplan embrio kedelai terhadap salinitas dapat bertahan hingga kadar salinitas (NaCl) 0,5% dalam media kultur. Kalus yang memiliki daya toleransi hingga kadar NaCl 0,5% dapat diregenerasikan menjadi tanaman kedelai dan dikembangkan untuk menghasilkan tanaman kedelai yang memiliki ketahanan terhadap salinitas di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

Andaryani, S. 2010. Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara *in vitro*. Skripsi, Surakarta: Universitas Sebelas Maret.

Ayuningrum, K., I, Budisantoso. dan Kamsinah. 2015. Respon Pemberian Hormon 2,4D dan BAP terhadap Pertumbuhan Subkultur Kalus Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill secara *In Vitro*. Biosfera 32 (1) Januari 2015.

Babu, S. 2007. Effect of salt stress in he selection of salt tolerant hybrids in rice under in vitro and in vivo condition. Asian Journal of Plant Sciences. 6(1): (2007) 137-142.

Bariyyah, K. 2015. Pengaruh NaCl Terhadap Kalus Tebu Varietas Bululawang. Jur.Agroekotek 7 (1) : 1 – 5.

Dodds, J. H. dan Roberts, L.W. 1984. Experiments in Plant Tissue Culture.Cambridge University Press. Cambridge

Gunawan, L. W. 1992. Teknik Kultur Jaringan Tuumbuhan. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Fathin, F. dan B. S. Triono. 2015. Seleksi In Vitro Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Talango dan Manding terhadap Cekaman Salinitas. Jurnal Sains dan Seni ITS. Vol. 4 (1) (2015).

Fatmawati, H. 2008. Kajian konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman *Artemisia annua* L. secara in vitro. Skripsi. Surakarta: Universitas Sebelas Maret

Fauziyyah, D., T. Hardiyati, dan Kamsinah. 2012. Upaya Memacu Pembentukan Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) Dengan Pemberian Kombinasi 2,4-D Dan Sukrosa Secara Kultur *In Vitro*. JPP Vol. 12 No. 1. Diakses pada laman https://media.neliti.com/media/publications/117126-ID-upaya-memacu-pembentukan -kalus-eksplan-e.pdf

Finariyah, F. dan T. B. Saputro. 2015. Seleksi *In Vitro* Tanaman Jagung (*Zea Mays* L.) Varietas Talango dan Manding Terhadap Cekaman Salinitas. Jurnal Sains dan Seni ITS Vol. 4, No.1

Hanifah, N. 2007. Pengaruh Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.

Hidayah, N. 2020. Pembentukan Kalus Mutan Padi Sawah (*Oryza sativa* L.) Varietas Inpari 42 Agritan GSR Toleran NaCl. Skripsi. Fakultas Pertanian, Institu Pertanian Bogor: Bogor.

Kadir, A. 2006. Induksi dan Perbanyakan Populasi Kalus, Regenerasi Tanaman serta Uji Respon Kalus terhadap Konsentrasi PEG dan Dosis Iradiasi Sinar Gamma. Makassar. Fakultas Pertanian Universitas Islam Makassar.

Kresnawati, E. (2006). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh NAA Dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus Dari Daun Nilam (Pogostemon cablin Beth). Skripsi tidak diterbitkan. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta

Lisdyayanti, N. D., S. Anwar, dan A. Darmawati. 2019. Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Kalus dan Seleksi Tingkat Toleransi Padi (*Oryza sativa* L.) Terhadap Cekaman Salinitas Secara *In Vitro.* Jurnal Berkala Bioteknologi, Vol.2, No.2.

Mahadi, I., Wulandari, S., Omar, A. 2014. Pengaruh Naftalen Acetyl Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) Terhadap Pembentukan Kalus Tanaman Rosella (Hibiscus Sabdariffa) sebagai Sumber Belajar Konsep Bioteknologi Bagi Siswa SMA. Jurnal Biogenesis. 11(1): 1–7.

Manurung, B. H., R. I. Damanik. dan E. S. Bayu. 2018. Kombinasi 2,4 D dan BAP Untuk Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) Pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro. Jurnal Agroekoteknologi FP USU Vol.6.No.1, Januari 2018 (12): 86- 92

Mayerni. R., B. Satria., D. K. Wardhani., dan S. R. O. S. Chan. 2020. Effect of Auxin (2,4-D) and Cytokinin (BAP) in Callus Induction of Local Patchouli Plants *(Pogostemon cablin* Benth.*)* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science

Muller, E., P.T.H. Brown, S. Hartke, dan H. Lorz. 1990. DNA variation in tissue-culture derived rice plants. Theor. Appl. Genet. 80:673-679.

Pessarakli, M. 1991. Dry Matter Yield, Nitrogen -15 Absorption, and Water Uptake by Green Bean under Sodium Chloride Stress. Crop Sci.31: 1633 -1640.

Rahayu, B., Solichatun dan Anggarwulan, E. (2003). Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid klutur kalus Acalypha indica L. Biofrms, 1(1):1-6.

Setyaningrum, R. 2011. Efektivitas 2,4- Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin terhadap Induksi dan Kandungan Klorofil serta Karotenoid Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Abstrak Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Departemen Pendidikan Nasional Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

Shilpi, M. dan T. Narendra. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444 (2005) 139 -158.

Soeparjono, S. 2014. Induksi Mutan Untuk Seleksi Ketahanan Terhadap Salinitas Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara *In Vitro.* Jember, 22-23 Oktober 2014.

Sugiarto, L. dan C. K. Paramita. 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) terhadap pertumbuhan kalus daun binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta analisis kandungan flavonoid total. Jurnal Penelitian Saintek, 19 (1): hal.

Syahid, S. F., dan Hernani. 2001. Pengaruh Komposisi Media terhadap Pertumbuhan Kalus dan KadarTannin dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) secara Kultur In Vitro. Jurnal Littri, 16 (1) : 1-5.

Ubudiyah, I. W. A., dan N. Tutik. 2013. Respon Kalus Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) pada Kondisi Cekaman Salinitas (NaCl) secara *In Vitro*. Jurnal Sains dan Semi Pomits, Vol 2 (3) : 2337-3520.

Wattimena, G. A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Bogor : Lembaga Sumberdaya Informasi IPB.

Widoretno, W., E. L. Arumningtyas dan Sudarsono. 2002. Metode Induksi Pembentukan Embrio Somatik dari Kotiledon dan Regenerasi Planlet Kedelai Secara In Vitro. IPB, Bogor.

Yuniati, R. 2004. Penapisan galur kedelai *Glycine max* (L.) Merrill toleran terhadap NaCl untuk penanaman di lahan marginal. Jurnal Makara Sains 8 (1): (2004) 21-24

Yunita, R., N. Khumaida, D. Sopandie and I. Mariska. 2014. Growth and regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus in salt medium. Bioscience Research. Volume 11(1): (2014) 04-09.

Yunita, R., N. Khumaida, D. Sopandie, dan I. Mariska. 2018. Analisis Cekaman Salinitas Terhadap Padi Mutan pada Kondisi *In Vitro*. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. Vol 2 (1): 25-34.