



KALOGENESIS EKSPAN SETENGAH BIJI KORO BENGUK (*Mucuna pruriens* L.) SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN BAP DAN NAA

Queen KA Marthani[✉], Yustinus U Anggraito¹, Enni S Rahayu¹

¹Prodi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Gedung D6 Lt.1 Jl. Raya Sekaran Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima Januari 2016
Disetujui Maret 2016
Dipublikasikan April 2016

Keywords:

BAP, kalogenesis, kalus, *Mucuna pruriens*, NAA.

Abstrak

Koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) adalah salah satu jenis kacang-kacangan lokal yang bisa digunakan sebagai pengganti kedelai dalam pembuatan tempe. Biji koro benguk merupakan sumber terbesar dari L-Dopa yang menjadi prekursor neurotransmitter digunakan untuk pengobatan penyakit Parkinson. Ekstraksi L-Dopa dalam skala besar membuat populasi *Mucuna* di alam bebas semakin terbatas. Sehingga, salah satu cara memperoleh bibit yang bermutu tinggi dapat dilakukan dengan perbanyak tanaman secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan respon dan konsentrasi BAP dan NAA yang optimum dalam kalogenesis eksplan setengah biji koro benguk. Rancangan dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 4x4 dengan perlakuan konsentrasi BAP (2, 3, 4, 5 ppm) dan NAA (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ppm) dengan dua ulangan. Parameter yang diamati adalah waktu inisiasi kalus, persentase eksplan yang berkalus, diameter kalus, warna dan tekstur kalus. Analisis data menggunakan anava dua arah dan uji lanjut Beda Nyata Terkecil. Hasil penelitian menunjukkan interaksi BAP dan NAA berpengaruh nyata terhadap waktu berkalus dan persentase berkalus, sedangkan konsentrasi NAA berpengaruh nyata terhadap diameter kalus eksplan setengah biji *Mucuna pruriens*. Kombinasi perlakuan yang direkomendasikan dalam penelitian kalogenesis ini adalah perlakuan BAP 2 ppm dan NAA 0,2 ppm karena kombinasi perlakuan tersebut memerlukan waktu berkalus paling pendek, memiliki persentase eksplan yang berkalus & diameter kalus paling besar, kalus berwarna hijau dan tekstur kalus yang *friable*.

Abstract

Mucuna pruriens L. is one of the local leguminosae which has many variety and used as a main material to substitute the soybean. The seed of *M. pruriens* are reported to contain L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa), a neurotransmitter precursor, used in the treatment of Parkinson's disease. Large-scale extraction of L-Dopa from the wild populations of this plant has led to its limited availability in natural condition. Therefore, *in vitro* plant culture techniques may be an effective alternative for produce high quality seed. These objectives of this study are to determine the half-seed explants responses and the optimal concentration of BAP and NAA besides it also the interaction between them in caulogenesis. The experiment had been conducted by using 16 combination of BAP (2, 3, 4, 5 ppm) and NAA (0.2; 0.4; 0.6; 0.8 ppm) with Completely Randomized Design (CRD) in 4x4 factorial pattern by two replicates. The emerging of callus, the percentage, callus diameter, color and texture of the callus were the indicators observed. Collected data were analyzed using anova and followed by Least Significance Difference (LSD) ($\alpha=5\%$). The result of this research showed that the interaction of BAP and NAA affect in callus growth process (growth process and growth percentage) on half seed explant of *Mucuna pruriens*, meanwhile the concentration of NAA affect in the size of callus diameter. Combination treatment recommended in this research were BAP 2 ppm and NAA 0,2 ppm.

© 2016 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lt.1, Jl. Raya Sekaran,
Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229
E-mail: queen.marthani@gmail.com

PENDAHULUAN

Sebagai salah satu kacang-kacangan lokal, koro benguk dapat digunakan sebagai bahan bahan komoditi alternatif sebagai pengganti kedelai (Atun, 2009). Kandungan gizi *Mucuna pruriens* tidak kalah dengan kedelai yaitu karbohidrat 61%, protein 29% serta kandungan lemak yang rendah yaitu 7% (Pugalenthi *et al.*, 2005), sedangkan pada kedelai kandungan karbohidrat 34%, protein 35%, serta lemak 18% (Badan Ketahanan Pangan dan Penyuluhan, 2014). Biji koro benguk merupakan sumber terbesar dari L-Dopa yang menjadi prekursor neurotransmitter (Daxenbichler *et al.*, 1971) digunakan untuk pengobatan penyakit Parkinson dan gangguan mental.

Koro benguk termasuk keluarga kacang-kacangan yang memiliki keragaman tinggi, namun belum dikembangkan secara maksimal karena usia tanam koro benguk yang relatif panjang (sekitar 6 bulan, sedangkan kedelai hanya 75-110 hari). Ekstraksi L-Dopa dalam skala besar membuat populasi *Mucuna* di alam bebas semakin terbatas. Selain itu, *Mucuna* diperbanyak melalui biji, tingkat perkecambahan dan viabilitas biji yang sangat rendah (Lahiri *et al.*, 2012).

Salah satu cara memperoleh bibit yang bermutu tinggi dapat dilakukan dengan memperbanyak tanaman secara *in vitro* atau kultur jaringan. Penggunaan teknik kultur jaringan dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak dalam waktu yang relatif singkat, selain itu tidak tergantung pada iklim dan musim serta kebutuhan bahan tanaman yang sedikit. Respon pertumbuhan kultur *in vitro* secara umum meliputi pembentukan kalus, diferensiasi dan embriosomatik. Diferensiasi dapat terjadi melalui dua cara, yaitu diferensiasi langsung dimana pembentukan organ tanpa melalui pembentukan kalus dan diferensiasi tak langsung yaitu terbentuknya organ didahului dengan pembentukan kalus dan organ akan muncul dari kalus tersebut (George & Sherington 1984). Pembentukan kalus sangat penting dalam proses

regenerasi tanaman karena memungkinkannya dihasilkan tunas dari sel-sel baru, bukan berasal dari meristem yang sudah ada sebelumnya. Menurut Evans *et al.* (2003), induksi kalus dipengaruhi oleh rasio auksin dan sitokinin yang seimbang, sehingga diperlukan kombinasi yang tepat agar dapat menginduksi pembentukan kalus yang optimal.

Golongan sitokinin yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah kinetin, zeatin, dan BAP (6-benzylaminopurine). Senyawa BAP sering digunakan karena bersifat tahan terhadap degradasi dan harganya lebih murah (Zulkarnain, 2009). Golongan auksin telah lama dikenal sebagai hormon yang mendasar dalam setiap aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Zhao, 2010). Salah satu golongan auksin yang paling banyak digunakan pada teknik kultur *in vitro* adalah NAA (*a-naphthalene acetic acid*). Senyawa NAA adalah ZPT sintetis yang mempunyai sifat lebih stabil lebih stabil sifat kimia dan mobilitasnya di dalam tanaman (Suprpto, 2004) dan tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi dibandingkan golongan auksin lainnya (Herawan & Ismail, 2004).

Penelitian baru-baru ini memfokuskan pada kotiledon karena bagian tersebut merupakan daerah yang berpotensi mengalami morfogenesis (Hu & Wang, 1999). Bagian tanaman yang banyak mengandung persediaan makanan serta bahan-bahan lain untuk pertumbuhan lebih mudah untuk beregenerasi dibanding dengan bagian tanaman yang kurang mengandung bahan makanan.

Penelitian mengenai kalogenesis dengan eksplan setengah biji pada *Fabaceae* telah dilakukan oleh beberapa peneliti di antaranya (Lahiri *et al.* 2012) induksi kalus biji koro benguk pada kombinasi NAA (10.75 μ M) dan BAP (4.44 μ M) menghasilkan kalus kompak dan berwarna hijau. Berdasarkan penelitian-penelitian terdahulu, maka perlu dilakukan penelitian mengenai kalogenesis eksplan setengah biji koro benguk menggunakan BAP dan NAA secara *in vitro* untuk mengembangkan protokol

kalogenesis koro benguk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon eksplan setengah biji koro benguk terhadap berbagai konsentrasi BAP dan NAA serta interaksi keduanya dalam kalogenesis dan untuk mengetahui konsentrasi BAP dan NAA yang optimum dalam kalogenesis eksplan setengah biji koro benguk.

METODE PENELITIAN

Biji koro benguk yang digunakan dalam penelitian ini adalah koro benguk berwarna putih, didapat dari Mojoreno, Sidoharjo, Wonogiri. Biji koro benguk dicuci dengan air mengalir dan direndam dengan antiseptik cair selama 10 menit kemudian bilas dengan air mengalir. Kemudian, biji koro benguk dicuci dan direndam dengan bakterisida dan fungisida selama 5 menit. Biji koro benguk selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit kemudian direndam dalam antiseptik cair dettol 20 % selama 3 menit, lalu dibilas dengan akuades 5 kali ulangan masing-masing 5 menit.

Eksplan yang digunakan adalah setengah biji. Untuk memperoleh eksplan setengah biji, biji koro benguk yang sudah disterilkan, diimbibisi satu malam, kemudian dikupas kulit bijinya dan dibelah menjadi dua kemudian kulit ari dan axis embrio dihilangkan. Proses tersebut dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Eksplan ditanam dalam media Murashige Skoog (MS) padat yang ditambah BAP (2; 3; 4; 5 ppm) dan NAA (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ppm). Parameter yang diamati dalam pembentukan kalus adalah waktu inisiasi kalus, persentase eksplan berkalus, diameter kalus, warna dan tekstur kalus. Perlakuan dinyatakan optimal bila mengakibatkan eksplan yang paling banyak tumbuh kalus, kemudian waktu inisiasi kalus tercepat, diameter kalus paling besar dan tekstur kalus *friable*. Data dianalisis dengan anava dua jalur menggunakan perangkat SPSS versi 22 pada aras probabilitas 5% untuk melihat pengaruh perlakuan. Apabila hasil uji anava dari setiap perlakuan signifikan, maka dilakukan uji lanjut menggunakan BNT dengan tingkat kepercayaan 95% untuk menganalisis perbedaan pengaruh antar kombinasi taraf perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil anava menunjukkan bahwa interaksi BAP dan NAA berpengaruh signifikan pada parameter waktu inisiasi kalus dan persentase eksplan berkalus. sedangkan pada parameter diameter kalus, hanya perlakuan NAA yang berpengaruh signifikan. Pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT) diketahui bahwa persentase eksplan yang berkalus paling tinggi sekitar 50-100% pada hampir semua perlakuan, kecuali perlakuan B1N3 (BAP 2 ppm NAA 0,6 ppm) dan B3N2 (BAP 4 ppm NAA 0,4 ppm). Sementara, diameter kalus paling besar terbentuk pada kombinasi perlakuan NAA 0,2; 0,4; 0,8 ppm.

Tabel 1. Pengaruh kombinasi BAP dan NAA terhadap waktu berkalus, persentase eksplan berkalus dan diameter kalus.

Sampel	BAPxNAA (ppm)	Waktu berkalus (hari)	Persentase eksplan berkalus	Diameter kalus (cm)
B ₁ N ₁	BAP 2 ppm + NAA 0,2 ppm	6 ^{defg}	75 ^{ab}	1,89
B ₁ N ₂	BAP 2 ppm + NAA 0,4 ppm	4,5 ^{bcdef}	75 ^{ab}	2,20
B ₁ N ₃	BAP 2 ppm + NAA 0,6 ppm	0 [*]	0 [*]	0 [*]
B ₁ N ₄	BAP 2 ppm + NAA 0,8 ppm	2,5 ^{abcd}	50 ^{abc}	2,40
B ₂ N ₁	BAP 3 ppm + NAA 0,2 ppm	3 ^{abcde}	50 ^{abc}	1,85
B ₂ N ₂	BAP 3 ppm + NAA 0,4 ppm	6,5 ^{efg}	75 ^{ab}	1,00
B ₂ N ₃	BAP 3 ppm + NAA 0,6 ppm	6 ^{defg}	50 ^{abc}	1,75
B ₂ N ₄	BAP 3 ppm + NAA 0,8 ppm	2 ^{abc}	50 ^{abc}	1,80
B ₃ N ₁	BAP 4 ppm + NAA 0,2 ppm	5 ^{bcdefg}	75 ^{ab}	0,82
B ₃ N ₂	BAP 4 ppm + NAA 0,4 ppm	4 ^{bcdef}	25 ^{bc}	0,85
B ₃ N ₃	BAP 4 ppm + NAA 0,6 ppm	8 ^g	50 ^{abc}	0,85
B ₃ N ₄	BAP 4 ppm + NAA 0,8 ppm	1,5 ^{ab}	50 ^{abc}	1,18
B ₄ N ₁	BAP 5 ppm + NAA 0,2 ppm	6 ^{defg}	100 ^a	1,82
B ₄ N ₂	BAP 5 ppm + NAA 0,4 ppm	2,5 ^{abcd}	50 ^{abc}	1,63
B ₄ N ₃	BAP 5 ppm + NAA 0,6 ppm	2,5 ^{abcd}	50 ^{abc}	0,90
B ₄ N ₄	BAP 5 ppm + NAA 0,8 ppm	4,5 ^{bcdef}	100 ^a	1,30

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda signifikan pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT) $\alpha=0,05$.

*: tidak membentuk kalus, karena mengalami *browning*

a: perlakuan yang membutuhkan waktu inisiasi tercepat, persentase eksplan berkalus dan diameter kalus yang paling besar.

Waktu inisiasi kalus

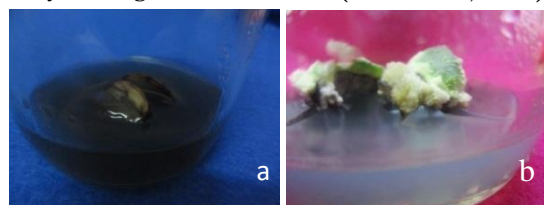
Interaksi BAP dan NAA berpengaruh signifikan pada parameter waktu inisiasi kalus. Waktu yang diperlukan untuk membentuk kalus tercepat adalah 1,5-3. Konsentrasi BAP 2 ppm dan NAA 0,8 ppm memiliki rerata paling cepat dalam munculnya kalus. Hasil tersebut juga tidak jauh berbeda dengan penelitian Hayati *et al.* (2010), bahwa pemberian kombinasi BAP dan NAA berpengaruh nyata terhadap waktu inisiasi kalus, serta terdapat interaksi antara BAP dan NAA dalam memacu waktu inisiasi kalus, kombinasi perlakuan BAP 0 ppm dan NAA 1 ppm, BAP 0 ppm dan NAA 2 ppm, BAP 1,5 ppm dan NAA 1 ppm dan BAP 1,5 ppm dan NAA 2 ppm menghasilkan waktu inisiasi kalus yang relatif cepat (4,4-5,4 hari), dengan waktu inisiasi kalus tercepat terjadi pada perlakuan BAP 0 ppm dan NAA 2 ppm. Sitokinin mampu memicu pembelahan sel pada jaringan dibantu oleh auksin pada konsentrasi optimal. Auksin dan sitokinin berperan bersama dalam pembelahan sel dengan mengontrol aktivitas dari CDK, enzim yang menyebabkan pembelahan sel pada sel-sel eukariot (Taiz & Zeiger, 2010).

Munculnya kalus pada eksplan merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*. Kadar BAP dan NAA eksogen yang seimbang diduga sebagai pemicu lebih awalnya eksplan mengalami dediferensiasi menjadikan sel lebih cepat menjadi meristematik kembali sehingga kalus terbentuk lebih awal. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). (Santoso & Nursandi, 2004) menyatakan bahwa pada dasarnya kalus juga dapat dibentuk oleh tanaman sebagai upaya perlindungan terhadap pelukaan yang berguna sebagai jaringan penutup luka. Jika ada luka maka ada proses induksi pembelahan sel untuk menutup permukaan yang luka dan berperan dalam hal ini adalah sitokinin.

Persentase eksplan yang membentuk kalus

Interaksi BAP dan NAA pada berbagai tingkat konsentrasi diketahui berpengaruh signifikan terhadap persentase eksplan yang membentuk kalus. Pada uji Beda Nyata Terkecil

(BNT) diketahui bahwa persentase eksplan yang membentuk kalus paling tinggi sekitar 50-100% pada hampir semua perlakuan kecuali perlakuan B1N3 (BAP 2 ppm NAA 0,6 ppm) dan B3N2 (BAP 4 ppm NAA 0,4 ppm). Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Mamun *et al.* (2004), yang menginduksi kalus *Albizia lebbbeck* (*Fabaceae*) dengan eksplan segmen internodal justru menghasilkan respon pembentukan kalus 100% pada media MS kombinasi perlakuan BAP 2 ppm dan NAA 0,2–0,5 ppm. Nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal dalam kultur jaringan dengan eksplan yang berbeda kemungkinan membutuhkan ZPT yang berbeda untuk pertumbuhan yang diharapkan (Espino *et al.*, 2004). Erisen *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa induksi kalus terbaik dengan frekuensi 100% pada media MS yang mengandung BAP 4 ppm dan NAA 0,5 ppm dari eksplan daun *Astragalus cariensis*. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Yusnita, 2004) bahwa kadang-kadang sitokinin dibutuhkan untuk memunculkan kalus. Auksin eksogen meningkatkan ekspresi AHK4 selama pembentukan kalus, sementara sitokinin meregulasi ekspresi *PINFORMEDs* (PINs) *auxin efflux carriers* dan YUCCAs (YUCs) *auxin biosynthetic genes* dalam kalus (Jones *et al.*, 2010).



Gambar 1. Respon eksplan setengah biji koro benguk terhadap perlakuan BAP dan NAA (a) eksplan tidak bisa diinduksi (b) eksplan yang berhasil diinduksi.

Kombinasi yang tidak membentuk kalus sama sekali adalah media dengan kombinasi BAP 2 ppm dan NAA 0,6 ppm. Hal ini disebabkan eksplan yang tenggelam tidak akan dapat tumbuh menjadi kalus, karena area tumbuh kalus yaitu pada irisan (jaringan yang luka) tertutup oleh medium. Perbedaan laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang

tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah (Wardani *et al.*, 2004).

Diameter kalus

Pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT) diketahui diameter terbesar pada perlakuan NAA 0,2; 0,4; 0,8 ppm yakni sekitar 1,42-1,67 cm. Berbeda dengan penelitian Esmaeili *et al.* (2016) kalus berukuran maksimum dihasilkan pada medium yang mengandung BAP 2 ppm dan NAA 0,5 ppm dari eksplan kotiledon *Astragalus adscendens*. Ukuran kalus yang dihasilkan pada tiap media perlakuan berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh kemampuan jaringan dalam menyerap air dan unsur hara berbeda-beda yaitu kemampuan mengadakan proses difusi, osmosis dan tekanan turgor sel (Sriyanti, 2000).

Peningkatan diameter kalus menunjukkan adanya proses pertumbuhan. Menurut Suprpto (2004), auksin dapat meningkatkan tekanan *osmotic*, sintesa protein, dan permeabilitas sel terhadap air. Hal ini menyebabkan air dapat masuk ke dalam sel sehingga volume kalus meningkat. Dengan adanya peningkatan sintesa protein, maka dapat digunakan sebagai sumber tenaga dalam pertumbuhan. Secara khusus, sel-sel tumbuhan memperluas dengan mengambil air tanpa mensintesis komponen sitoplasma baru. Ekspansi sel dengan mekanisme ini ditandai dengan auksin yang melemahkan daerah dari dinding sel, sehingga tekanan turgor mendorong perluasan sel. Air yang mengalir ke dalam sel terakumulasi dalam vakuola sentral yang besar, sehingga sel mengembang tanpa meningkatkan volume sitosol nya. Ekspansi tersebut dapat menghasilkan peningkatan 10 sampai 100 kali lipat dalam ukuran sel tanaman selama pengembangan (Cooper, 2000).

Tekstur dan Warna kalus

Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi BAP 3, 4, 5 ppm membentuk kalus remah, sedangkan konsentrasi BAP 2 ppm menghasilkan kalus kompak. Warna kalus bervariasi pada berbagai tingkat konsentrasi perlakuan. Kombinasi perlakuan BAP 2 ppm NAA 0,2 ppm; BAP 3 ppm

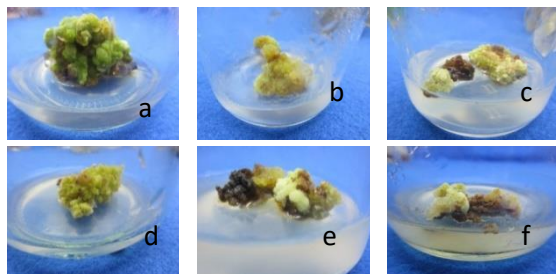
NAA 0,8 ppm; BAP 4 ppm NAA 0,6 ppm; BAP 4 ppm NAA 0,8 ppm; BAP 5 ppm NAA 0,2 ppm; BAP 5 ppm NAA 0,4 ppm menghasilkan warna kalus putih. Warna putih dengan struktur kalus yang kompak memperlihatkan adanya kapasistas embriogenik dari massa kalus yang bersangkutan. Hal ini telah dibuktikan oleh sejumlah peneliti, baik pada tanaman non-legum maupun pada tanaman legum (Fathia & Zulkarnain, 2007). Sedangkan kalus warna cokelat terlihat pada kombinasi perlakuan BAP 3 ppm NAA 0,6 ppm dan BAP 4 ppm NAA 0,4. Warna coklat pada kalus, menandakan bahwa kalus telah mengalami fase penuaan. Pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut telah memasuki fase stasioner (penuaan) sehingga menyebabkan produksi metabolit sekunder menurun (Purnamaningsih & Ashrina, 2011).

Kalus warna hijau terlihat pada kombinasi perlakuan BAP 3 ppm NAA 0,4 ppm dan BAP 5 ppm NAA 0,8. Sedangkan kalus warna hijau muda terlihat pada kombinasi perlakuan BAP 2 ppm NAA (0,4; 0,6; 0,8) ppm, BAP 4 ppm NAA 0,2 ppm dan BAP 3 ppm NAA 0,2 ppm. Medium B5 dengan konsentrasi 2 ppm NAA + 0,5 ppm BAP potensial untuk menghasilkan kalus *friable* dan hijau yang cocok untuk regenerasi dan transformasi genetik. Penggunaan hormon NAA dan BAP berpengaruh nyata terhadap morfogenesis eksplan tanaman alfalfa yaitu menghasilkan kalus di semua perlakuan (Tripathy *et al.*, 2014).

Kalus yang diinduksi BAP dan NAA dapat menghasilkan kalus yang berwarna putih, putih kehijauan dan hijau. Perubahan warna yang terjadi pada kalus akibat adanya pigmen dan dipengaruhi oleh nutrisi dan faktor lingkungan seperti cahaya (Evans *et al.*, 2003). Warna kalus yang hijau disebabkan adanya konsentrasi sitokinin (BAP) dalam media. Interaksi sitokinin dan cahaya terang mempengaruhi perkembangan kloroplas dan ekspresi gen (Chen, 1989).

Tekstur kalus bervariasi pada berbagai tingkat konsentrasi perlakuan. Kombinasi perlakuan BAP 2 ppm NAA (0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8 ppm), BAP 3 ppm NAA 0,8 ppm; BAP 4 ppm NAA 0,2 ppm membentuk kalus kompak.

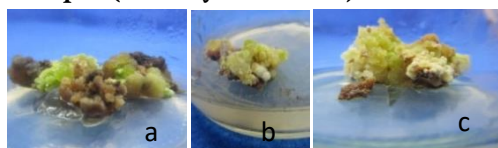
Kombinasi perlakuan BAP 3 ppm NAA (0,2; 0,4; 0,6 ppm), BAP 4 ppm NAA (0,4; 0,6; 0,8 ppm), BAP 5 ppm NAA (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ppm) membentuk kalus remah.



Gambar 2. Warna dan tekstur kalus (a) kalus berwarna hijau, bertekstur *non friable* (b) kalus berwarna putih kehijauan, bertekstur *friable* (c) kalus berwarna putih, bertekstur *friable* (d) kalus berwarna hijau, bertekstur *friable* (e) kalus berwarna putih dan coklat, bertekstur *friable* (f) kalus berwarna putih, bertekstur *friable*.

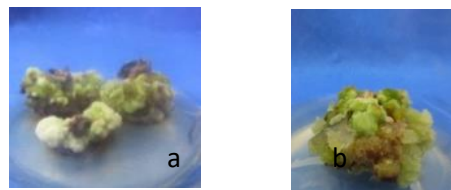
Terbentuknya kalus yang remah ini juga dipengaruhi oleh penambahan sitokinin (BAP) dalam media yang sudah mengandung auksin. Syahid *et al.* (2010), menambahkan bahwa adanya sitokinin dapat meningkatkan pembelahan sel dalam proses sitokinesis terutama pada saat sintesis RNA dan protein akan memacu aktivitas auksin dalam pembelahan sel membentuk kalus. Hal ini terlihat pada konsentrasi BAP yang semakin meningkat menghasilkan kalus yang semakin remah.

Tahap II (Perbanyakan Kalus)



Gambar 3. Perbanyakan kalus (a) perlakuan BAP 5 ppm, (b) 10 ppm, (c) 15 ppm.

Pada perlakuan BAP 5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm, eksplan kalus yang dikulturkan membentuk kalus yang semakin remah. Konsentrasi sitokinin yang tinggi memiliki efek negatif pada pembentukan tunas dan menyebabkan pembentukan kalus (Hasançebi *et al.*, 2011).



Gambar 4. Perbanyakan kalus (a) pada kombinasi perlakuan BAP 2 ppm dan GA 4 ppm dan (b) kombinasi perlakuan BAP 4 ppm dan GA 2 ppm.

Eksplan kalus juga diregenerasikan pada media BAP dan GA, hasilnya menunjukkan bahwa kalus memiliki tekstur remah dan tidak cepat mengalami pencoklatan. Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian Zhou *et al.* (2009), konsentrasi Gibberelin 25 ppm efektif menekan *browning* pada eksplan daun *Phalaenopsis*. GA3 meregulasi ekspresi gen PAL dan mengurangi aktivitas PAL (*phenylalanine ammonia-lyase*) enzim dalam proses *browning*.

SIMPULAN

Eksplan setengah biji koro benguk dapat membentuk kalus dengan media MS yang dikombinasikan dengan BAP dan NAA. Kecepatan pembentukan kalus dan persentase jumlah eksplan yang membentuk kalus dipengaruhi oleh interaksi konsentrasi BAP dan NAA. Diameter kalus dipengaruhi oleh konsentrasi NAA secara terpisah.

Berdasarkan hasil penelitian kombinasi perlakuan yang direkomendasikan dalam penelitian kalogenesis ini adalah perlakuan BAP 2 ppm dan NAA 0,2 ppm karena kombinasi perlakuan tersebut memerlukan waktu berkalus paling pendek, memiliki persentase eksplan yang berkalus & diameter kalus paling besar, kalus berwarna hijau dan tekstur kalus yang *friable*.

DAFTAR PUSTAKA

- Atun, S. (2009). *Kandungan nutrisi dan potensi pemanfaatan koro benguk*. Makalah kegiatan PPM Pelatihan Beberapa Teknologi Pengembangan Produk Pangan Sesuai Potensi Daerah untuk Menumbuhkan Jiwa Wirausaha

- sebagai Upaya Meningkatkan Kesejahteraan Masyarakat Pedesaan Kulon Progo, 26 Juli.
- [BKPP] Badan Ketahanan Pangan dan Penyuluhan. (2014). Data kandungan gizi bahan pangan dan hasil olahannya. DIY. Diakses tanggal 25 Mei 2016
- Chen, C. M. (1989). Cytokinin-modulated macromolecular synthesis and gene expression. In S Kung, CJ Arntzen (Eds), *Plant Biotechnology* (pp. 245-256). London: Butterworths.
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell*, 2nd edition: A Molecular Approach. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Daxenbichler, M. E. (1971). Seeds as sources of L-Dopa. *Med. Chem.* 14: 463-465.
- Erisen, S., Yorgancilar, M., Atalay, E., & Babaoglu, M. (2009). Prolific shoot regeneration of *Astragalus cariensis* Boiss. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 100(2): 229-233.
- Esmacili, G., Azizi, M., Aroei, & Samiei, L. (2016). Micropropagation of *Astragalus adscendens*: a source of gaz-angabin manna in Iran (Persian Manna). *J. Agr. Sci. Tech.* 18: 741-750
- Espino, F. J., Linacero, R., Rueda, J., & A. M, Vazouez. (2004). Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes. *Biol. Plant.* 48: 101-104.
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D., Kearns, A. (2003). *Plant Cell Culture*. New York: Bios Scientific.
- Fathia, N. M. E., & Zulkarnain. (2007). Respon in vitro antera kedelai terhadap zat pengatur tumbuh. *Jur. Agronomi.* 11 (2).
- George E. F & P. D Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Comercial Laboratoryes*. England: Easter Press.
- Hasançebi, S., Turgut, K., Çakir, N., & Ari, S. (2011). Micropropagation and root culture of turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Turk. J. Bot.* 35: 203-210.
- Hayati, S. K., Yulita, N., & Nintya, S. (2010). Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara *in vitro* dengan penambahan *benzyl amino purine* (BAP) dan *α-naphthalene acetic acid* (NAA). *BIOMA.* 12(1): 6-12.
- Herawan, T., & Ismail, B. (2009). Penggunaan kombinasi auksin dan sitokinin untuk menginduksi tunas pada kultur jaringan sengon (*Falcataria moluccana*) menggunakan bagian kotiledon. *Jur. Pemuliaan Tanaman Hutan.* 3(1): 23-31.
- Hu, C. Y., & Wang, L. (1999). Soybean transformation technologies developed in China: procedure, confirmation and field performance. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 35: 417-420.
- Jones, B., Gunnerås, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., & Ljung, K. (2010). Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell.* 22: 2956-2969.
- Lahiri, K., Mukhopadhyay, M. J., Desjardins, Y., & Mukhopadhyay, S. (2012). Rapid and stable *in vitro* regeneration of plants through callus morphogenesis in two varieties of *Mucuna pruriens* L. – an anti Parkinson's drug yielding plant. *Nucleus*, 55(1):37-43
- Mamun, A. N. K., Matin, M. A., Bari., N. A., Siddique., R. S., Sultana., Rahman, M. H., & Musa, A. S. M. (2004). Micropropagation of woody legume (*Albizia lebbeck*) through tissue culture. *Pak J Biol Sci.* 7(7): 1099-1103.
- Pugalenthi, M., Vadivel, V., & Siddhuraju, P. (2005). Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. Utilis--a review. *Plant Foods Hum Nutr.* 60(4): 201-218.
- Purnamaningsih, R., & Ashrina, M. (2011). Pengaruh BAP dan NAA terhadap induksi kalus dan kandungan artemisin dari *Artemesia annua* L. *Berita Biologi*, 10(4): 481-489.
- Santoso, U., & F. Nursandi. (2004). *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Penerbit UMM.
- Sriyanti, D. P. (2000). Pelestarian tanaman nilam (*Pogostemon heyneanus* Benth.) melalui kultur mikrostek. *BioSMART* 2 (2): 19-22.
- Suprpto, A. (2004). Auksin zat pengatur tumbuh penting meningkatkan mutu stek tanaman. *Jurnal utm.* 21(1): 81-90.
- Syahid., Fatimah, S., Natalini, N. K., & Deliah, S. (2010). Pengaruh komposisi media terhadap pertumbuhan kalus dan kadar tannin dari daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) secara *In Vitro*. *Jurnal Litri*, 16(1): 1-5.
- Taiz, L., & E. Zeiger. (2010). *Plant Physiology*. Edisi Kelima. Massachusetts: Sinauer Associates Ink.
- Tripathy, S. K., Swain, D., Mishra, P. K., Baisakh, B., & Dash, S. (2014). Optimization of callus induction in *Lathyrus sativus* L. *Afr. J. Food Sci. Technol.* 5(3):60-66.
- Wardani, D. P., Solichatun., Setyawan, A. D. (2004). Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada variasi penambahan asam 2,4- diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan kinetin. *Biofarmasi*, 2 (1): 35-43.
- Yusnita. (2003). *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 61:49-64.
- Zhou, W., Rufang, Tan., Chuanjun, Xu., Yanyan, Lai., Dongyin, Chen., Ling, Li. (2009). Gibberelic acid inhibit browning, enzym activity and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in *Phalaenopsis* leaf explant. *Genes, Genomes, and Genomic.* 3(1):68-71.
- Zulkarnain. (2009). *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara.