

RESPON PEMBENTUKAN KALUS KORO BENGUK (*MUCUNA PRURIENS* L.) PADA BERBAGAI KONSENTRASI 2,4-D DAN BAP

R Ariani[✉] Y U Anggraito, E S Rahayu

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Februari 2016
Disetujui Maret 2016
Dipublikasikan April 2016

Keywords:
BAP; 2,4-D; kalus; koro benguk

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan benzylamino purin (BAP) optimal dalam pembentukan kalus dari eksplan setengah biji koro benguk (*Mucuna pruriens* L.). Rancangan penelitian yang digunakan ialah rancangan acak lengkap dengan dua faktor, yaitu konsentrasi 2,4-D (0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm) dan BAP (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm) untuk induksi kalus. Hasil induksi dipindahkan pada media MS0, kemudian dilanjutkan pada media MS yang ditambah BAP, IBA, GA. Parameter yang diamati adalah waktu terbentuk kalus, persentase eksplan berkalus, berat kalus per eksplan, warna dan tekstur kalus. Pada tahap induksi kalus, BAP 3 mg/l menyebabkan pertumbuhan kalus terberat dibandingkan konsentrasi lainnya. Sementara pada tahap diferensiasi, konsentrasi BAP 3 ppm dan 2,4-D 1 ppm merupakan konsentrasi yang mengakibatkan persentase kalus sehat tertinggi. Perlakuan 2,4-D 1 ppm dan BAP 3 ppm menghasilkan kalus putih transparan, kompak, dan berat kalus tertinggi (0,49 gram). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang disarankan untuk menumbuhkan kalus koro benguk

Abstract

*This research aimed to determine the optimal concentration of 2,4-D and BAP in callus formation from an explant of half seed *Mucuna pruriens*. The research design was used completely randomized design with two factors: the concentration of 2,4-D (0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2 ppm) and BAP (1 ppm, 2 ppm, and 3 ppm) for callus inductions. The induction result is moved to MS0 medium, then continued to MS medium which was added by BAP, IBA, GA. The measured parameters were: callus formation time, the percentage of callus explants, the weight of callus for each explants, color and texture of callus. During induction phase BAP 3 ppm caused the heaviest callus growth than others, meanwhile in differentiation phase BAP 3 ppm and 2,4-D 1 ppm caused the highest percentage of healthy callus. Treatment of 2,4-D 1 ppm and BAP 3 ppm produced white and compact transparent callus with weight 0.49 grams. This concentration was recommended to grow the *M. pruriens* callus.*

© 2016 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 1 Sekaran Gunungpati Semarang
E-mail: restiunnes@gmail.com

ISSN 0215-9945

PENDAHULUAN

Koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) merupakan salah satu jenis kacang-kacangan lokal yang memiliki beragam varietas dan biasa digunakan sebagai bahan baku pengganti kedelai dalam pembuatan tempe. Masyarakat banyak memanfaatkan biji koro benguk untuk dibuat tempe (tempe benguk), *geblek*, *besengek*, kecap dan untuk produksi susu benguk (Purwaningsih 2008). Pada daerah-daerah tropis, koro benguk dimanfaatkan sebagai bahan makanan pengganti, pakan ternak, kopi, dan tempe. Namun di beberapa Negara, koro benguk digunakan untuk berbagai macam tujuan pengobatan (Chikagwa-Malunga *et al.* 2009).

Koro benguk mempunyai potensi yang baik sebagai sumber protein alternatif dengan harga terjangkau di kalangan masyarakat luas. Vadivel dan Pugalenth (2008) menyebutkan bahwa kandungan protein dan lipid pada biji mentah koro benguk adalah 273,2 dan 60,61 g/kg, dan karbohidrat sebesar 374,6 g/kg. Koro benguk juga mengandung berbagai macam komposisi mineral, asam lemak, dan vitamin. Kandungan mineral yang terdapat dalam koro benguk adalah K, Ca, Mg, P, Fe, Mn, Zn, Cu (Mohan & Kalidass 2011).

Konsumsi koro benguk di Indonesia (Wonogiri dan Gunung Kidul Yogyakarta) lebih rendah dibandingkan kacang-kacangan lainnya seperti kacang tanah dan kedelai. Rendahnya tingkat konsumsi tersebut disebabkan adanya kandungan anti-nutrisi seperti asam sianida (HCN) dan *L-3,4 Dihydroxyphenylalanine* (L-Dopa) yang dapat menyebabkan keracunan apabila dijadikan bahan makanan atau pakan ternak (Widianarko *et al.* 2003). Upaya perbaikan mutu tanaman dapat dilakukan melalui kajian fisiologis, molekuler, dan pemuliaan tanaman secara konvensional. Perakitan varietas baru dalam rangka memperbaiki mutu tanaman banyak dilakukan dengan memanfaatkan teknologi transformasi genetik. *Finer et al.* (1997) menyatakan bahwa regenerasi tanaman melalui jalur embriogenesis banyak digunakan untuk menghasilkan tanaman transgenik dengan memanfaatkan vektor *Agrobacterium* maupun dengan teknik penembakan partikel genetik. Keberhasilan transfer gen untuk menghasilkan tanaman dengan

sifat tertentu sangat tergantung pada kemampuan eksplan membentuk embrio somatik dan beregenerasi menjadi tanaman (Nolan & Rose 2010).

Efektivitas kepanjangan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan bergantung pada konsentrasi hormon endogen yang berinteraksi dengan hormon eksogen (Davies 2004). Senyawa *2,4-dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) merupakan auksin kuat yang banyak digunakan untuk menginduksi dan meningkatkan frekuensi kalus embriogenik. *Benzylamino purin* (BAP) merupakan sitokinin sintetik aktif yang tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman serta sangat efektif dalam menstimulasi proliferasi dan induksi tunas (Gray 2005). George & Sherrington (1984) menyatakan, penggunaan konsentrasi ZPT dalam jumlah seimbang antara sitokinin dan auksin menstimulasi eksplan untuk membentuk kalus. Apabila konsentrasi sitokinin diperbesar, akan mengarah pada pembentukan dan perbanyakan tunas. Perbedaan respon pada suatu eksplan dapat disebabkan oleh faktor genotip eksplan, jenis eksplan, dan ZPT media tanam (Pierik 1987).

Kalus yang mempunyai struktur embriogenik umumnya lebih berpotensi untuk dilanjutkan pada tahap diferensiasi. Proses diferensiasi tanaman membutuhkan serangkaian ZPT yang tepat untuk mengoptimalkan induksi tunas dari kalus-kalus embriogenik. Sitokinin BAP merupakan ZPT yang efektif digunakan dalam mendorong keberlanjutan perkembangan kalus (George & Sherrington 1984). Penambahan *indole-3-butyric acid* (IBA) pada medium berfungsi untuk membantu penumbuhan akar, sehingga penyerapan nutrisi lebih optimal dan pertumbuhan semakin cepat. Beberapa penelitian menunjukkan adanya komponen lain yang ditambahkan pada medium untuk memaksimalkan perkembangan eksplan, di antaranya arang aktif, *Gibberelic acid* (GA), maltosa, dan asam amino.

Penentuan konsentrasi yang tepat, penting untuk mendapatkan respon optimum eksplan. Konsentrasi ZPT yang terlalu rendah tidak memunculkan respon induksi yang berarti, dan konsentrasi yang terlalu tinggi justru menjadi toksik bagi tanaman (Gaba 2005). Kombinasi formula yang tepat antara 2,4-D, BAP, IBA atau komponen lain perlu diketahui untuk melihat

respon induksi kalus dan perkembangan kultur koro benguk. Hasil penelitian berguna sebagai protokol awal sebelum masuk pada proses embriogenesis dan transformasi untuk perbaikan kualitas nutrisi, hasil produksi, toleransi stres biotik dan abiotik, atau berbagai pengembangan penelitian lainnya.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Bahan penelitian berupa biji koro benguk masak panen dari Desa Mojoreno Kecamatan Sidoharjo Kabupaten Wonogiri Jawa Tengah. Eksplan yang digunakan adalah setengah biji yang diperoleh dengan cara biji dibuang kulit arinya dan dibelah secara longitudinal kemudian dibuang aksis embrionya. Eksplan ditanam dalam media *Murashige Skoog* (MS) padat yang ditambah 2,4-D (0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm) dan BAP (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm) selama 4 minggu. Parameter yang diamati adalah waktu terbentuk kalus, persentase eksplan berkalus, berat kalus, warna dan tekstur kalus, embrio yang terbentuk.

Memasuki tahap perkembangan dan diferensiasi, kalus dipindahkan pada media MS0 dan dikulturkan selama 4 minggu. Parameter yang diamati adalah persentase eksplan berkalus sehat dan morfologi kalus. Setelah dikulturkan selama 4 minggu, kalus disubkultur pada media yang sama atau langsung dipindahkan pada media BAP, IBA dan GA.

Data yang diperoleh dianalisis dengan *Two Ways* ANAVA menggunakan perangkat SPSS versi 17.0 pada aras probabilitas 5% untuk melihat pengaruh perlakuan. Apabila hasil uji dari setiap perlakuan signifikan maka dilakukan uji lanjut UJGD (Uji Jarak Berganda Duncan) dengan tingkat kepercayaan 95% untuk menganalisis perbedaan pengaruh antar kombinasi taraf perlakuan (Gomez & Gomez, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Embriogenik

Data hasil pengamatan waktu terbentuk kalus eksplan setengah biji koro benguk selama 1 bulan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Waktu terbentuk kalus (hari) setelah satu bulan penanaman

Konsentrasi (ppm)	2,4D	Konsentrasi BAP (ppm)		
		1	2	3
0,5		6,7	6,3	7,7
1		5,7	6,7	6,0
1,5		6,0	5,7	7,3
2		6,3	5,0	6,0

Hasil analisis varian dua jalan menunjukkan tidak ada pengaruh signifikan konsentrasi BAP, 2,4-D dan interaksi BAP x 2,4-D terhadap waktu terbentuk kalus sehingga tidak dilakukan Uji Jarak Ganda Duncan (UJGD). Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa waktu terbentuknya kalus cenderung lebih cepat ketika konsentrasi 2,4-D meningkat. Ketika konsentrasi auksin eksogen ditingkatkan, protein *Aux/IAA* pada eksplan menjadi tidak stabil akibat degradasi yang terjadi dengan cepat, dan tidak terjadi proses akumulasi. Akibatnya *Aux/IAA* berhenti melakukan penekanan gen dan auksin berekspresi (Hagen *et al.* 2004). Hasil ini sejalan dengan penelitian Permadi *et al.* (2014) bahwa waktu terbentuk kalus lebih cepat ketika konsentrasi auksin meningkat. Kalus biasanya muncul pertama kali pada area eksplan yang terluka. Adanya luka pada eksplan menyebabkan ZPT eksogen lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan dan bekerja sama dengan ZPT endogen untuk membentuk kalus dengan menstimulasi pembelahan sel terutama pada area luka. Munculnya kalus pada bagian terluka juga dikarenakan adanya rangsangan dari jaringan eksplan untuk menutupi luka yang diawali dengan pembentangan dinding sel dan penyerapan air, kemudian sel akan melakukan pembelahan sel (George & Sherrington 1984).

Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus setelah perlakuan selama satu bulan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase eksplan berkalus setelah satu bulan penanaman (%)

Konsentrasi (ppm)	2,4D	Konsentrasi BAP (ppm)		
		1	2	3
0,5		33,3	58,3	75,0
1		41,7	63,8	58,3
1,5		58,3	41,7	28,3
2		50,0	41,7	36,

Hasil analisis varian dua jalan menunjukkan tidak ada pengaruh signifikan konsentrasi BAP, 2,4-D dan interaksi BAP x 2,4-D terhadap persentase berkalus sehingga tidak dilanjutkan UJGD. Data di atas menunjukkan bahwa persentase eksplan berkalus koro bengkok bervariasi. Persentase eksplan berkalus cenderung semakin menurun ketika konsentrasi 2,4-D ditingkatkan, namun persentase yang rendah tidak selalu menunjukkan kualitas kalus yang buruk. Beberapa perlakuan dengan hasil persentase tinggi menunjukkan kualitas kalus yang mudah rusak dan minim kandungan air. Hasil ini berbeda dengan penelitian Harisaranraj *et al.* (2008) bahwa persentase kalus semakin meningkat seiring bertambahnya konsentrasi ZPT. Kemampuan eksplan dalam membentuk kalus, selain akibat pengaruh ZPT endogen juga dipengaruhi oleh genotip eksplan, umur eksplan, lingkungan kultur, dan koresponsifan masing-masing eksplan (Zulkarnain 2009).

Berdasarkan hasil pengukuran berat kalus selama perlakuan 1 bulan diperoleh data seperti tersaji pada table 3.

Tabel 3. Berat kalus per eksplan selama satu bulan penanaman (g)

Konsentrasi (ppm)	2,4D	Konsentrasi BAP (ppm)		
		1	2	3
0,5		0,29	0,44	0,47
1		0,41	0,20	0,49
1,5		0,44	0,19	0,38
2		0,41	0,19	0,43

Hasil pengukuran berat kalus per eksplan setengah biji koro bengkok bervariasi antar taraf perlakuan. Penyebab dari peristiwa tersebut

dimungkinkan karena tingkat koresponsifan masing-masing eksplan dalam membentuk kalus berbeda. Adapun penyebab lainnya adalah pengaruh fisiologis eksplan yang mengeluarkan butiran air hitam ketika dikulturkan. Kondisi tersebut menyebabkan media berubah warna menjadi kecoklatan bahkan hitam. Bhojwani & Razdan (1996) menyebutkan, pada kultur *in vitro* beberapa spesies tanaman dapat menyebabkan terjadinya oksidasi substansi fenolik yang dilepaskan oleh eksplan melalui permukaan dan umumnya menyebabkan *browning* pada medium. Medium akan berubah warna menjadi coklat sampai coklat tua dan terkadang meracuni jaringan yang ditanam. Pada beberapa eksplan, perubahan media menjadi coklat sampai hitam akibat peristiwa tersebut tidak menghalangi perkembangan eksplan dalam memperbanyak jumlah kalus, namun eksplan-eksplan tertentu justru mengalami kemunduran fisiologis dan mati. Keadaan ini menunjukkan bahwa batas toleran masing-masing eksplan terhadap kondisi tersebut tidak sama.

Analisis varian dua jalan menunjukkan ada pengaruh signifikan konsentrasi BAP terhadap berat kalus yang dikulturkan (Tabel 4). Taiz & Zeiger (2010) menyatakan sitokinin bekerja dengan mempercepat durasi fase G2 menuju fase M, sehingga meningkatkan laju sintesis protein dan pembelahan semakin cepat. D'Agostino & Kieber (2002) menambahkan bahwa pada transisi G2 menuju M, sitokinin juga berperan mengatur *on-off* nya *cyklin dependen kinase* (CDK) seperti *cdc2*, *cdk4*, dan *cdk6* dengan cara bergabung pada siklin spesifik. Pada tahap G2, sitokinin masuk dan menstimulasi *cdc2* inaktif menjadi aktif dengan melibatkan protein kinase *wee 1*. Selanjutnya *cdc2* bergabung dengan siklin tipe B pada tahap G2 akhir dan menyebabkan CDK pada posisi *on*. Masuk pada tahap G1, sitokinin bekerja untuk mengaktifkan siklin tipe D (*CyD3*) dengan melibatkan *cyklin activating kinase* (CAK). Adanya sitokinin eksogen menyebabkan transkrip *cdc2* dan *CyD3* mengalami peningkatan. Meningkatnya ekspresi *CycD3* sinergis dengan meningkatnya proliferasi sel.

Tabel 4. Hasil perhitungan UJGD pada BAP (g)

Perlakuan	Rerata Berat Kalus
BAP 1 ppm	1,55 ^a
BAP 2 ppm	1,01 ^b
BAP 3 ppm	1,76 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf sama, menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan hasil UJGD.

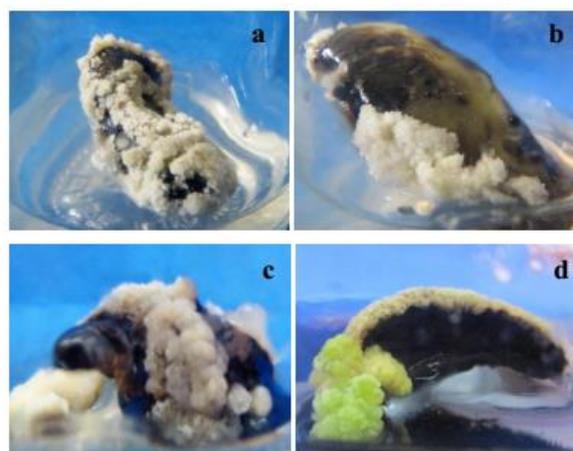
Bertambahnya berat kalus erat kaitannya dengan kandungan air, kecepatan sel membelah dan pembesaran sel. Adanya proses pembelahan dan pembesaran sel menyebabkan jumlah dan besar sel bertambah sehingga berat kalus meningkat. Hasil UJGD menunjukkan bahwa konsentrasi BAP yang mampu menginduksi berat kalus paling optimal ialah BAP 3 ppm. Kombinasi perlakuan BAP 3 ppm dan 2,4-D 1 ppm menghasilkan berat kalus tertinggi sebesar 0,49 g. Hasil ini sejalan dengan penelitian Radhakrishnan & Ranjitakumari (2007) bahwa pada eksplan setengah biji kedelai dengan penambahan BAP 3-4 mg/l memberikan hasil terbaik dalam menginduksi pengkalusan.

Indikator perkembangan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus digunakan untuk menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui sel masih aktif membelah atau telah mati. Hasil pengamatan penampilan visual kalus berupa warna dan tekstur kalus pada media induksi BAP dan 2,4-D disajikan pada Tabel 5.

Kalus yang terbentuk pada media tanam dengan BAP dan 2,4-D rata-rata berwarna putih dan kompak (Gambar 1a). Eksplan yang ditanam pada media dengan penambahan BAP 1 ppm dan 3 ppm memiliki respon pembentukan kalus yang berbeda dari BAP 2 ppm. Kalus yang muncul pada media perlakuan dengan penambahan BAP 2 ppm rata-rata muncul dalam bentuk remah dan mudah rusak (Gambar 1b). Pada proses induksi, beberapa kalus ditemukan berwarna putih transparan (Gambar 1c) atau hijau (Gambar 1d)

Tabel 5. Warna dan tekstur kalus pada media induksi selama 1 bulan perlakuan

No.	Perlakuan	Warna dan Tekstur Kalus
1.	B1D1	kalus putih dan kompak
2.	B1D2	kalus putih transparan dan kompak
3.	B1D3	kalus putih transparan dan kompak
4.	B1D4	kalus putih kehijauan dan kompak
5.	B2D1	kalus putih kompak
6.	B2D2	kalus putih remah
7.	B2D3	kalus putih dan remah
8.	B2D4	kalus putih dan remah
9.	B3D1	kalus putih dan kompak
10.	B3D2	kalus putih transparan dan kompak
11.	B3D3	kalus putih dan kompak
12.	B3D4	kalus putih dan kompak



Gambar 1. Warna dan tekstur kalus yang tumbuh pada media tanam. (a) Kalus putih kompak pada media BAP 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm (b) Kalus putih remah pada media BAP 2 ppm dan 2,4-D 2 ppm (c) Kalus putih transparan pada media BAP 3 ppm dan 2,4-D 1 ppm (d) Kalus hijau pada media BAP 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm.

Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna dan tekstur kalus yang berbeda-beda. Pierik (1987) menyatakan tekstur yang terbentuk pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga remah atau putih sampai hijau, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, ZPT, dan kondisi lingkungan kultur. Kalus yang terbentuk pada media tanam yang ditambah BAP dan 2,4-D, rata-rata berwarna putih dan kompak, beberapa kalus juga bersifat remah. Kalus kompak pada media induksi dengan penambahan auksin 2,4-D tersusun padat dan susah dipisahkan sedangkan kalus remah tersusun renggang, rapuh dan minim kandungan air. Hasil ini berbeda dengan kalus yang tumbuh pada medium MS

dengan penambahan NAA. Eksplan yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan auksin NAA menumbuhkan kalus yang remah, berwarna hijau sedikit buram dan kandungan air tinggi (Marthani 2016). Berdasarkan respon tersebut, ditengarai eksplan koro benguk lebih responsif terhadap auksin jenis NAA daripada 2,4-D.



Gambar 2. Perbandingan kalus koro benguk yang berhasil diinduksi umur tiga minggu (A) Kalus yang diinduksi 2,4-D 0,5 ppm dan BAP 3ppm (B) Kalus yang diinduksi NAA 0,2 ppm dan BAP 3 ppm.

Diferensiasi Kalus

Pada tahap subkultur pada Media MS0, kalus yang dihasilkan pada tahap induksi dipindah pada medium MS0 untuk meningkatkan proliferasi kalus dan memicu perkembangan lebih lanjut.

Hasil pengamatan persentase kalus yang sehat pada medium MS0 selama satu bulan disajikan pada Tabel 6. Uji anava persentase kalus sehat yang disubkultur pada media MS0 menunjukkan bahwa perlakuan BAP dan 2,4-D secara terpisah memberikan pengaruh yang signifikan (Tabel 7 & 8). Persentase eksplan berkalus yang sehat pada media MS0 menunjukkan beberapa perlakuan cenderung meningkat, namun terdapat juga beberapa perlakuan yang menurun (Tabel 2 dan Tabel 6). Pada media MS0, rata-rata kalus memperbanyak jumlah kalus dengan melakukan penebalan. Kalus-kalus yang sebelumnya remah dan mudah rusak pada media induksi terlihat menumbuhkan kalus baru dengan struktur lebih kompak dan kandungan air yang cukup. Hasil UJGD menunjukkan bahwa konsentrasi BAP 3 ppm dan konsentrasi 2,4-D 2 ppm merupakan konsentrasi yang optimal dalam meningkatkan proliferasi kalus pada MS0.

Tabel 6. Persentase eksplan berkalus sehat selama 1 bulan pada medium MS0 (%)

Konsentrasi 2,4D (ppm)	Konsentrasi BAP (ppm)		
	1	2	3
0,5	16,67	41,67	66,67
1	41,67	8,33	75,00
1,5	41,67	52,32	46,67
2	80,00	75,00	75,00

Keterangan: Notasi a merupakan hasil perhitungan data hilang

Tabel 7. Hasil perhitungan UJGD pada BAP (g)

Perlakuan	Rerata Persentase Kalus yang Sehat
BAP 1 mg/l	45,00 ^b
BAP 2 mg/l	44,33 ^b
BAP 3 mg/l	71,91 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf sama berarti tidak berbeda nyata berdasarkan hasil UJGD.

Tabel 8. Hasil perhitungan UGD pada 2,4-D (g)

Perlakuan	Rerata Persentase Kalus yang Sehat
2,4-D 0,5 mg/l	41,67 ^c
2,4-D 1 mg/l	41,67 ^c
2,4-D 1,5 mg/l	44,17 ^b
2,4-D 2 mg/l	76,67 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf sama berarti tidak berbeda nyata berdasarkan hasil UJGD.

Pada tahap ini, eksplan rata-rata mampu menumbuhkan kalus-kalus baru pada media MS0, namun media sangat rentan berubah warna menjadi coklat bahkan hitam sehingga perlu dilakukan subkultur pada medium baru untuk meminimalkan resiko keracunan pada eksplan. Secara umum, eksplan dapat berkembang baik dalam medium MS0, tetapi beberapa eksplan masih mengeluarkan butiran air hitam dari permukaan kalus. Keadaan tersebut menyebabkan media menjadi basah dan mengakibatkan eksplan mudah terkontaminasi.

Pengamatan visual warna dan tekstur kalus pada media MS0 disajikan pada Tabel 9.

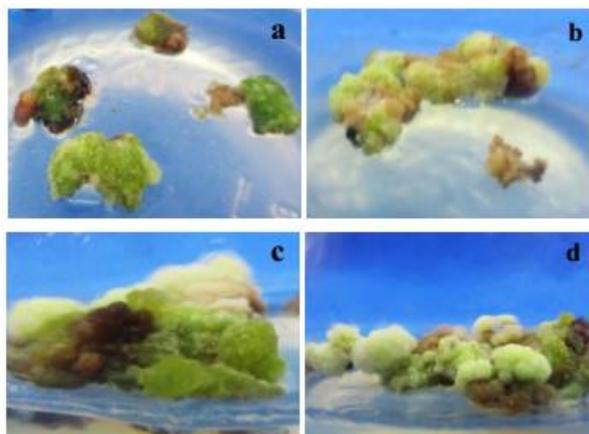
Tabel 9. Warna dan tekstur kalus setelah 1 bulan pada media MS0

No.	Perlakuan	Warna dan Tekstur Kalus
1.	B1D1	kalus putih dan kompak
2.	B1D2	kalus putih kekuningan dan kompak
3.	B1D3	kalus transparan kehijauan dan kompak
4.	B1D4	kalus kehijauan dan kompak
5.	B2D1	kalus putih kompak
6.	B2D2	<i>browning</i>
7.	B2D3	kontaminasi
8.	B2D4	kalus putih transparan dan kompak
9.	B3D1	kalus putih kekuningan dan kompak
10.	B3D2	kalus putih kekuningan dan kompak
11.	B3D3	kalus transparan kehijauan dan kompak
12.	B3D4	kalus transparan kehijauan dan kompak

Kalus yang dikulturkan pada umumnya berwarna putih kekuningan dengan struktur kompak (Gambar 3a), tetapi didapatkan pula kalus dengan warna kehijauan dan kompak (Gambar 3b). Pengkalusan pada media MS0 selama 30 hari belum memperlihatkan adanya perkembangan kalus embrionik secara jelas.

**Gambar 3.** Warna dan tekstur kalus pada media MS0 setelah 30 hari penanaman (a) Kalus putih kompak (b) Kalus putih kehijauan kompak

Penyelamatan dalam rangka mendapatkan kalus embrionik dilakukan dengan subkultur pada medium yang sama setelah bagian-bagian yang mengalami pencoklatan dihilangkan (Gambar 4a). Potongan kalus sisanya yang bertekstur halus, berwarna putih sampai hijau dan secara fisiologis terlihat baik dikulturkan kembali. Hasil subkultur bervariasi antar taraf perlakuan antara lain kalus putih mengalami perubahan menjadi kehijauan (Gambar 4b), kalus membesar dan menambah volume (Gambar 4c) dan memunculkan kalus-kalus baru berwarna putih (Gambar 4d). Hasil penyelamatan selanjutnya dipindahkan ke medium MS yang mengandung BAP 1,5 ppm, IBA 0,5 ppm, dan GA 0,5 ppm untuk memicu perkembangan embrio lebih lanjut.

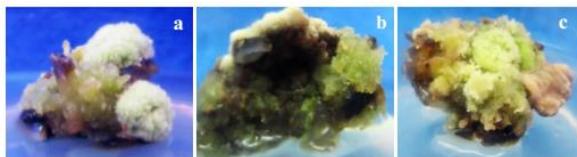
**Gambar 4.** Hasil penyelamatan kalus dengan subkultur berulang pada minggu ke-3 (a) dan (b) Subkultur dari BAP 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm; (c) dan (d) Subkultur dari BAP 3 ppm dan 2,4-D 2 ppm

Subkultur pada medium dengan penambahan BAP, IBA dan GA

Pemeliharaan dalam medium MS0 selama 4 minggu ternyata menghasilkan kalus dengan kualitas lebih baik. Kalus yang disubkultur pada media BAP, IBA, dan GA umur 28 hari belum terlihat adanya pembentukan embrio *heart*, torpedo atau bakal tunas, namun rata-rata kalus berkembang sehat dan mengarah pada warna hijau. Kalus-kalus dengan warna hijau dapat disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya dipengaruhi tingkat pencahayaan yang tercukupi sehingga kalus dapat melangsungkan fotosintesis.

Pada perkembangannya, kalus tumbuh dengan meningkatkan jumlah embrio globular dan beberapa kalus membentuk pemanjangan sel, namun tidak mengarah pada bentuk embrio yang spesifik. Pengamatan pada hari ke-48, kalus pada perlakuan BAP 1 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm yang disubkultur pada media kombinasi BAP, IBA dan GA menunjukkan adanya tonjolan-tonjolan pada permukaan kalus (Gambar 5a). Perlakuan BAP 1 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm yang lain menunjukkan adanya sekelompok kecil sel-sel meristematik yang mengalami pembesaran membentuk cuping-cuping kecil pada permukaan kalus menyerupai embrio *heart* (Gambar 5b). Hal serupa juga terjadi pada perlakuan BAP 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm, ditemukan kalus yang membentuk cuping seperti embrio *heart* pada hari ke-42. Adapun perbedaan dari keduanya ialah kalus lebih transparan dan

mengkilap pada 2,4-D 1,5 ppm dan lebih buram pada 2,4-D 2 ppm.



Gambar 5. Perkembangan kalus pada media MS yang ditambah BAP, IBA, dan GA (a) Kalus BAP 1 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm hari ke-48 membentuk nodul-nodul permukaan kalus (b) Kalus BAP 1 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm hari ke-48 membentuk percabangan kalus menyerupai embrio hati (c) Kalus BAP 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm hari ke-42 membentuk percabangan kalus menyerupai embrio hati, tepi kalus mulai coklat.

Pengkulturan selama umur 56 hari, rata-rata eksplan yang teramati tidak menunjukkan kemajuan perkembangan walaupun telah dilakukan subkultur. Beberapa eksplan terlihat mengalami pencoklatan (Gambar 5c) dan beberapa diantaranya hanya terlihat memperbanyak sel-sel baru yang tidak embriogenik. Bhojwani & Razdan (1996) menyebutkan, keadaan tersebut dapat dikarenakan oleh kondisi fisiologis kalus yang cenderung mengalami penurunan dan kehilangan sifat embrioniknya akibat terlalu sering dilakukan subkultur.

SIMPULAN

Konsentrasi BAP dan 2,4-D serta interaksi keduanya tidak berpengaruh terhadap waktu terbentuknya kalus dan persentase eksplan berkalus, namun konsentrasi BAP berpengaruh terhadap berat kalus yang diinduksi dari eksplan setengah biji koro benguk. Pada tahap diferensiasi, konsentrasi BAP dan 2,4-D secara terpisah berpengaruh terhadap peningkatan persentase kalus yang sehat. Konsentrasi yang paling optimal untuk pertumbuhan kalus eksplan setengah biji koro benguk adalah BAP 3 ppm dan 2,4-D 1 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

Bhojwani SS & Razdan MK. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. A Revised Edition. Amsterdam: Elsevier. Hal: 779

- Chikagwa-Malunga SK, Ade S, Ogan AT, Sollenberger LE, Badinga LK, Szabo NJ & Littell RC. 2009. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148(1): 34-50.
- D'agostino & Kieber JJ 1999. Molecular mechanism of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol.* 2(5):359-364.
- Davies PJ. 2004. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. Hal: 776
- Finer JJ, Santarem ER & Pelissier B. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 33: 13-19.
- Gaba VP. 2005. Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. 87-99. In: RN Trigiano and DJ Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- George EF & Sherrington PD. 1984. *Propagation by Tissue Culture*. London: Exegetics Ltd
- Gomez KA & Gomez AA. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian* Ed.2. Terjemahan Endang S & Justika SB. Jakarta: UI Press.
- Gray DJ. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue: nonzygotic embryogenesis, 187-200. In: RN Trigiano and DJ Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- Hagen G, Guilfoyle TJ & Gray WM. 2004. Auxin signal transduction. In: Davies PJ (Eds.) *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher.
- Harisaranraj R, Babu SS & Suresh K. Callus induction and plant regeneration of *Vigna mungo* (L.) Hepper via Half Seed Explant. *Ethnobotanical Leaflets.* 12: 57-85
- Marthani QKA. 2016. Kalogenesis Eksplan Setengah Biji Koro Benguk Secara in vitro Menggunakan BAP dan NAA. *Skripsi*. Semarang: FMIPA Unnes
- Mohan VR & Kalidass C. 2011. Nutritional and antinutritional composition of itching bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC var. Pruriens): an underutilized tribal pulse in Western Ghats, Tamil Nadu. *J Trop Subtrop Agroecosystems.* 14: 279-293.
- Nolan KE & Rose RJ. 2010. Plant regeneration-somatic embryogenesis. 39-59. In: Davey MR & Anthony P (Eds.). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. UK: Wiley-Blackwell Publisher. Hal 345.
- Permadi AB, Santoso IB & Kamsinah. 2014. Upaya Memacu Pembentukan Kalus dari Eksplan Kacang Tanah (*Arachis hypogaea*) dengan 2,4-D

- dan Kinetin. *Skripsi*. Purwokerto: Fakultas Biologi UNSOED
- Pierik RLM. 1987. *In Vitro Culture Higher Plant*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. Hal: 346
- Purwaningsih D. 2008. *Teknologi Pembuatan Susu Dari Tempe Benguk*. FMIPA: UNY.
- Radhakrishnan R & Ranjitakumari BD. 2007. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *J Agric Technol*. 3(2): 287-297.
- Taiz L & Zeiger E. 2010. *Plant physiology 3rd edition*. Massachusetts: Sinauer Associates. Hal: 623
- Vadivel V & Pugalenth M. 2008. Removal of antinutritional and improvement in the protein digestibility of velvet bean seeds. *J Food Sci Technol*. 45: 242-246.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara