

Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*medicago sativa* L.) secara *in vitro* dengan Penambahan Benzyl Amino Purine (BAP) dan α -Naphthalene Acetic Acid (NAA)

Surya Kurnia Hayati, Yulita Nurchayati dan Nintya Setiari

Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan Jurusan Biologi FMIPA Undip

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is useful plant for treatment some diseases such as: cancer, diabetes, lupus, and hepatitis. Propagation of this plant in Indonesia face a problem which has no embryo. One method to propagate this plant is by tissue culture or micropropagation. Callus induction is first step in micropropagation to produce callus which will be regenerated to become planlet. The aims of this research are to induce callogenesis from hipocotyl of alfalfa with addition Benzyl Amino Purine (BAP) and α Naphtalene Acetic Acid (NAA), and to determine the proper combination of BAP and NAA to produce the optimal callus. The experiment has been conducted by using 12 combination of BAP and NAA with Completely Randomized Design (CRD) in 4x3 factorial pattern by 5 replicates. Data were analyzed by ANOVA 95% Degrees of Freedom (DF). If there was significance result, it was followed by DMRT analyzed at 95 % DF. The result showed that combination of BAP and NAA was able to induce callogenesis from hipocotyl of alfalfa. The optimal callus was obtained in combination of BAP 0 ppm and NAA 2 ppm.

Keyword: *Medicago sativa* L., *callus*., *hipocotyl*, Benzyl Amino Purine (BAP) and α Naphtalene Acetic Acid (NAA)

Abstrak

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tanaman yang dapat digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit seperti: kanker, diabetes, lupus, dan hepatitis. Perbanyakkan tanaman ini masih mengalami hambatan diantaranya tidak mengandung embrio. Perbanyakkan tanaman tersebut dapat melalui kultur jaringan atau mikropropagasi. Induksi kalus merupakan salah satu tahap dalam mikropropagasi untuk menghasilkan kalus yang dapat diregenerasikan menjadi planlet. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui induksi pembentukan kalus alfalfa dengan pemberian kombinasi Benzyl Amino Purine (BAP) dan α Naphtalene Acetic Acid (NAA) serta mengetahui kombinasi BAP dan NAA yang tepat untuk menghasilkan kalus yang optimal. Rancangan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 4x3 dengan perlakuan konsentrasi BAP dan NAA 4 x 3 dengan 5 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA pada taraf uji 95 %. Apabila terdapat beda nyata maka akan diuji lebih lanjut dengan uji DMRT pada taraf uji 95 %. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi BAP dan NAA mampu menginduksi pembentukan kalus dari hipokotil alfalfa. Kalus yang optimal dihasilkan pada kombinasi BAP 0 ppm dan NAA 2 ppm.

Kata Kunci: *Medicago sativa* L., *callus*, *hipocotyl*, Benzyl Amino Purine (BAP) and α Naphtalene Acetic Acid (NAA)

PENDAHULUAN

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan Leguminosae yang berkhasiat menyembuhkan penyakit kanker, diabetes, lupus, dan hepatitis. Alfalfa dikenal sebagai penghasil klorofil yang digunakan sebagai bahan suplemen makanan. Klorofil adalah molekul organik pada tumbuhan,

dengan struktur seperti haemoglobin pada manusia, yang dapat meningkatkan ketahanan tubuh. Alfalfa juga mengandung karotenoid, asam amino, flavonoid, fito-estrogen, dan saponin. Manfaat alfalfa lainnya adalah sebagai pakan ternak dan penghasil minyak (Peretty & Horne, 2007).

Potensi yang besar dari alfalfa mendorong petani Indonesia untuk membudidayakannya. Namun, budidaya alfalfa di Indonesia masih terhambat dalam penyediaan benih. Biji alfalfa yang dihasilkan dari tanaman yang ditumbuhkan di Indonesia tidak memiliki embrio sehingga tidak dapat dikedambahkan. Hal ini menyebabkan benih alfalfa masih harus diimpor dari Arab, Cina, dan Amerika (Rahmayati & Sitanggang, 2006; wawancara yang tidak dipublikasikan, 2007).

Mikropropagasi atau perbanyakan secara *in vitro* merupakan salah satu metode perbanyakan secara vegetatif yang dapat menghasilkan bibit dalam jumlah banyak dalam waktu relatif cepat, memiliki sifat yang sama dengan induknya, dan proses pembibitan tidak tergantung musim (Suryowinoto, 1996). Mikropropagasi dapat dilakukan dengan perbanyakan tunas dari eksplan berupa mata tunas atau meristem, namun dapat pula terjadi secara tidak langsung melalui pembentukan kalus dari jaringan vegetatif, misalnya hipokotil. Selanjutnya kalus yang terbentuk dapat dirangsang untuk berdiferensiasi menjadi planlet (Hartman *et al.*, 1990; Suryowinoto, 1996). 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.

Berdasarkan hal tersebut di atas, pada penelitian ini dilakukan pemberian kombinasi ZPT, yaitu antara BAP dan NAA untuk mengetahui kombinasi konsentrasi yang tepat dalam menginduksi kalus yang optimal dari eksplan hipokotil alfalfa.

BAHAN DAN METODE

Penyediaan eksplan

Eksplan yang digunakan adalah hipokotil alfalfa (*Medicago sativa* L.), yang diambil dari kecambah alfalfa aseptik umur 8 hari atau sampai kedua kotiledon membuka.

Induksi Kalus

Hipokotil dipotong sepanjang 1 cm, kemudian di tanam dalam botol-botol kultur sesuai dengan 12 macam perlakuan media MS, setiap satu botol berisi satu potong

eksplan. Variabel yang diamati adalah waktu inisiasi kalus, berat basah kalus prosentase pertumbuhan kalus, respon eksplan, tipe kalus, dan warna kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Inisiasi Kalus

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian kombinasi BAP dan NAA berpengaruh nyata terhadap waktu inisiasi kalus, serta terdapat interaksi antara BAP dan NAA dalam memacu waktu inisiasi kalus. Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan B_0N_1 , B_0N_2 , B_3N_1 dan B_3N_2 menghasilkan waktu inisiasi kalus yang relatif cepat (4,4 -5,4 hari), dengan waktu inisiasi kalus tercepat terjadi pada perlakuan B_0N_2 . Waktu inisiasi kalus yang relatif lama terjadi pada eksplan yang ditumbuhkan pada media B_0N_0 dan B_2N_0 (9,6-10,4 hari).

Tabel 1. Rata-rata waktu inisiasi kalus (hari) hipokotil alfalfa yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi BAP dan NAA dalam berbagai konsentrasi

NAA (ppm)	BAP (ppm)				Rata-rata
	$B_0 = 0$	$B_1 = 0,5$	$B_2 = 1$	$B_3 = 1,5$	
N_0	9,6 ^f	7,8 ^e	10,4 ^f	7,8 ^e	8,9 ^x
N_1	4,8 ^{ab}	5,4 ^{bcd}	5,6 ^{bcd}	5,4 ^{abcd}	5,3 ^y
N_2	4,4 ^a	6,0 ^{cd}	6,2 ^d	5,0 ^{abc}	5,4 ^y
Rata-rata	6,3 ^x	6,4 ^x	7,4 ^y	6,1 ^x	

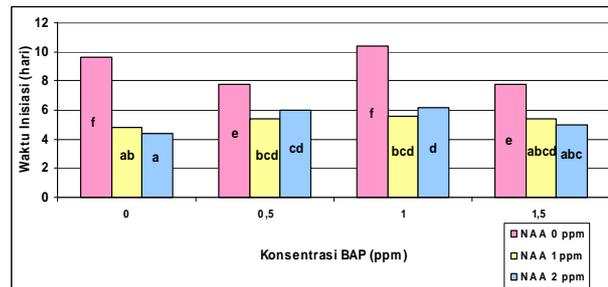
Keterangan: Angka-angka yang diikuti abjad yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil berbeda tidak nyata sedangkan yang tidak disertai abjad yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji ANOVA pada taraf signifikansi 95%.

Waktu inisiasi kalus dipengaruhi oleh interaksi kedua macam hormon yang ditambahkan pada media kultur, yaitu BAP dan NAA. Eksplan yang ditumbuhkan pada perlakuan B_0N_0 , yaitu tanpa pemberian BAP maupun NAA, waktu inisiasi kalusnya cukup lama (9,6 hari). Hal ini dimungkinkan karena dalam pertumbuhannya, eksplan hanya dipacu oleh komponen-komponen yang terlarut dalam media dan hormon endogen

eksplan. Komponen-komponen tersebut diperkirakan kurang mampu memenuhi kebutuhan eksplan, sehingga proses pertumbuhan berlangsung lambat.

Waktu inisiasi kalus hipokotil alfalfa yang ditumbuhkan pada media B_1N_0 , B_2N_0 , dan B_3N_0 juga relatif lebih lama (7-10 hari). Waktu inisiasi kalus yang cukup lama ini dimungkinkan, karena penambahan konsentrasi BAP pada media kurang berpengaruh dalam memacu waktu inisiasi kalus, sehingga waktu inisiasi kalus berlangsung lambat. Hipokotil alfalfa diduga mengandung konsentrasi sitokinin yang tinggi, karena sitokinin disintesis di akar kemudian ditransport menuju ke pucuk melalui xilem. Transport tersebut mengakibatkan konsentrasi sitokinin pada eksplan menjadi tinggi, karena hipokotil yang digunakan sebagai eksplan berada di sebelah bawah dari pucuk. Penambahan BAP secara eksogen akan semakin meningkatkan kandungan sitokinin dalam sel-sel eksplan. Konsentrasi auksin yang tinggi diduga menyebabkan ketidakseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin sehingga waktu inisiasi kalus lebih lambat.

Kemungkinan lain yang menyebabkan waktu inisiasi relatif lama karena eksplan hipokotil memerlukan sitokinin jenis lain atau ZPT jenis lain untuk menginduksi pembentukan kalus. Kebutuhan ZPT sangat ditentukan oleh jenis tanaman, artinya setiap tanaman membutuhkan jenis dan konsentrasi ZPT yang spesifik. Hal tersebut tampak pada induksi kalus pada eksplan hipokotil kapas (*Gossypium hirsutum* L.) yang diberi perlakuan BAP 1 ppm telah menunjukkan waktu inisiasi kalus yang relatif cepat (4 hari) setelah waktu penanaman (Sudarmadji, 2003). Contoh lain pada induksi kalus dari eksplan daun keladi tikus (*Typonium flagelliforme*. Lodd.) yang ditanam pada media MS dengan penambahan kinetin 0,3 ppm dan 2,4 D 1 ppm, waktu inisiasi kalus terjadi pada minggu ke delapan setelah penanaman (Syahid dan Kristina, 2007).



Gambar 1. Histogram rata-rata waktu inisiasi kalus (hari) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi BAP dan NAA dalam berbagai konsentrasi

Eksplan yang ditumbuhkan pada media B_0N_2 menunjukkan waktu inisiasi kalus tercepat. Kecepatan pertumbuhan yang terjadi pada eksplan dimungkinkan karena adanya interaksi yang tepat antara hormon sitokinin endogen eksplan dengan konsentrasi NAA yang ditambahkan. Hal ini mengakibatkan proses fisiologis dalam eksplan dapat berlangsung efektif dalam memacu awal pemunculan kalus.

Waktu inisiasi kalus pada perlakuan B_1N_1 , B_1N_2 , B_2N_1 , B_2N_2 , B_3N_1 , dan B_3N_2 relatif sama, yaitu pada hari ke 5 dan 6. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi yang diberikan pada media cukup tepat dalam memacu waktu inisiasi kalus, walaupun waktu tersebut masih lebih lama dibandingkan perlakuan BAP 0 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 1 ppm atau 2 ppm.

Berat Basah Kalus

Berdasarkan hasil uji ANOVA tampak bahwa terdapat interaksi antara BAP dan NAA dalam menentukan berat basah kalus. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa berat basah kalus yang tinggi dihasilkan dari eksplan yang ditumbuhkan pada media dengan perlakuan B_0N_1 , B_0N_2 , B_1N_1 , B_2N_1 , B_3N_1 , dan B_3N_2 , dengan berat basah kalus tertinggi terjadi pada perlakuan B_0N_2 . Berat basah kalus yang rendah dihasilkan dari eksplan yang ditumbuhkan pada media B_0N_0 , B_1N_0 , B_1N_2 , B_2N_0 , B_2N_2 , dan B_3N_0 , dengan berat basah kalus terendah terjadi pada perlakuan B_0N_0 .

Eksplan yang ditumbuhkan pada media B_0N_0 yaitu media tanpa ZPT hanya mengalami pembengkakan. Hal ini karena komponen-komponen yang terdapat dalam media belum mampu menginduksi pembentukan kalus. Eksplan

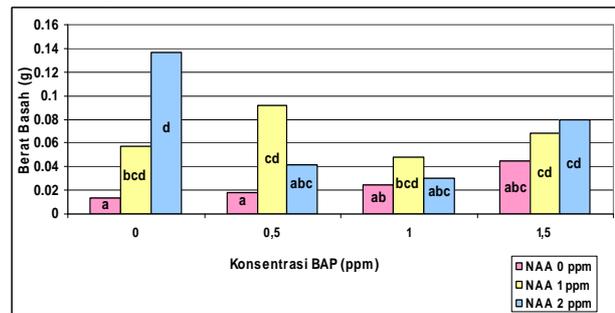
dalam pertumbuhannya hanya dipacu oleh sukrosa, makronutrien, mikronutrien, dan vitamin yang terlarut dalam media serta hormon endogen yang ada dalam eksplan. Menurut Hoesen (2001), senyawa nitrogen dan rasio antara ammonium dengan nitrat dapat mempengaruhi terjadinya proses-proses dediferensiasi, pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Berdasarkan hal tersebut, diduga media B₀N₀ hanya mampu menginduksi peningkatan volume eksplan namun belum mampu menginduksi pembelahan sel, sehingga eksplan hanya membengkak.

Kultur dengan perlakuan B₁N₀, B₁N₂, B₂N₀, B₂N₂, dan B₃N₀ menghasilkan berat basah kalus lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Berat basah kalus yang rendah terjadi karena eksplan hanya mengalami pembentukan kalus di sebagian permukaan eksplan. Pembentukan kalus pada sebagian permukaan eksplan juga berhubungan dengan waktu inisiasi kalus yang relatif lama karena ketidakseimbangan konsentrasi BAP dan NAA, sehingga sejak awal pertumbuhan eksplan berlangsung lambat. Hal tersebut menunjukkan bahwa pembentukan kalus ditentukan oleh keseimbangan konsentrasi antara auksin dan sitokinin (Evans *et al.*, 2003). Pernyataan tersebut sesuai dengan percobaan terhadap induksi kalus pada eksplan hipokotil *Beta vulgaris L.*, yang menunjukkan bahwa, kalus dapat terbentuk pada media MS yang ditambah BAP 1 ppm dan 2,4 D 0,1 ppm (Rel *et al.*, 2001). Konsentrasi BAP dan NAA pada kelima perlakuan tersebut diduga kurang dapat melakukan interaksi satu sama lain, sehingga proses metabolisme eksplan terganggu. Efektifitas suatu ZPT tergantung pada keberadaan ZPT yang lain dan konsentrasi zat tersebut di dalam sel. (Bhaskaran dan Smith, 1990)

Tabel 2. Rata-rata berat basah kalus (g) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi BAP dan NAA dalam berbagai konsentrasi

NAA (ppm)	BAP (ppm)				Rata-rata
	B ₀ = 0	B ₁ =0,5	B ₂ =1	B ₃ =1,5	
N ₀	0,0133 ^a	0,0175 ^a	0,0251 ^{ab}	0,0446 ^{abc}	0,0251 ^x
N ₁	0,0568 ^{bcd}	0,0918 ^{cd}	0,0480 ^{bcd}	0,0679 ^{cd}	0,0661 ^y
N ₂	0,1368 ^d	0,0414 ^{abc}	0,0297 ^{abc}	0,0794 ^{cd}	0,0718 ^y
Rata-rata	0,0689 ^x	0,0502 ^x	0,0343 ^x	0,0679 ^x	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti abjad yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil berbeda tidak nyata sedangkan yang tidak disertai abjad yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji ANOVA pada taraf signifikansi 95%.



Gambar 2. Histogram rata-rata berat basah kalus (g) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi konsentrasi BAP dan NAA

Media dengan perlakuan B₀N₂ mampu menghasilkan kalus dengan berat basah paling tinggi. Hal tersebut dimungkinkan karena pemberian konsentrasi NAA 2 ppm pada media menyebabkan keseimbangan konsentrasi antara auksin eksogen dan sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan. Keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* diketahui dapat memacu pembentukan kalus (Allan, 1991), melalui interaksi dalam pembesaran dan pembelahan sel.

Proses pembesaran sel terjadi karena pengaruh auksin. Auksin eksogen dalam hal ini NAA yang terlarut dalam media, akan berdifusi masuk ke dalam sel-sel eksplan melalui luka pada ujung-ujung eksplan. Auksin akan memacu pelunakkan dinding sel dengan cara mengaktifasi

pompa proton (ion H^+) yang terletak pada membran plasma, sehingga menyebabkan derajat keasaman (pH) pada bagian dinding sel lebih rendah, yaitu mendekati pH pada membran plasma (sekitar pH 4,5). Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen diantara mikrofibril selulosa dinding sel. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding sel mudah merenggang sehingga tekanan dinding sel akan menurun dan mengakibatkan pelenturan sel. Derajat keasaman yang rendah juga dapat mengaktifasi enzim tertentu pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein atau polisakarida yang menyebar pada dinding sel yang lunak dan lentur, sehingga pembesaran sel dapat terjadi (Catala *et al.*, 2000 dalam Aslamyah, 2002). Sitokinin selanjutnya berperan memacu pembelahan dalam jaringan meristematik. Peran sitokinin secara langsung adalah dalam proses transkripsi dan translasi RNA dalam proses sintesis protein (Catala *et al.*, 2000 dalam Aslamyah, 2002). Proses tersebut berlangsung dalam tahap interfase. Proses translasi RNA dilanjutkan dengan pembentukan asam-asam amino yang merupakan komponen dasar protein. Protein yang terbentuk antara lain berupa enzim-enzim yang berperan dalam pembelahan sel. Enzim-enzim tersebut misalnya enzim polymerase DNA yang berperan dalam memperpanjang rantai DNA dan memperbaiki kesalahan penyusunan basa nitrogen pada DNA dan enzim ligase yang berperan dalam menggabungkan fragmen-fragmen DNA yang terputus-putus saat proses replikasi. Ketersediaan enzim-enzim ini di dalam sel akan menyebabkan proses pembelahan sel berlangsung lebih efektif (Stansfield *et al.*, 2006).

Eksplan yang ditumbuhkan pada media dengan perlakuan selain B_0N_2 , sudah mampu menumbuhkan kalus dan menghasilkan berat basah kalus cukup, walaupun kurang optimal. Kombinasi konsentrasi yang diberikan diduga masih kurang tepat, namun belum bersifat menghambat pembentukan eksplan. Konsentrasi ZPT yang ditambahkan masih mampu menginduksi aktifitas enzim-enzim metabolisme dalam eksplan, sehingga kalus dapat terbentuk.

Persentase Pertumbuhan, Respon, Tipe dan Warna Kalus

Hasil pengamatan terhadap prosentase pertumbuhan kalus, menunjukkan bahwa pertumbuhan dapat terjadi pada seluruh eksplan hipokotil alfalfa yang ditumbuhkan pada 12 macam kombinasi perlakuan. Eksplan yang ditanam pada media B_0N_0 hanya mengalami pembengkakan saja, namun pada perlakuan lain, semua eksplan mengalami dediferensiasi membentuk kalus. Pertumbuhan yang terjadi pada seluruh eksplan dimungkinkan, karena eksplan mempunyai respon yang baik terhadap media tanam. Eksplan hipokotil yang digunakan pada percobaan ini mempunyai umur yang masih muda dan kondisi yang sehat, karena eksplan diisolasi dari biji alfalfa yang dikecambahkan secara aseptis. Eksplan yang muda, sel-selnya bersifat meristematis, sehingga masih aktif membelah. Kesehatan eksplan juga akan berpengaruh pada kondisi fisiologis sel dan proses-proses yang ada di dalamnya. Eksplan yang sehat, proses-proses fisiologisnya akan jauh lebih baik. Chawla (2003) menyatakan bahwa, eksplan yang berasal dari jaringan muda dan sehat umumnya lebih responsif dalam kultur *in vitro*, sehingga proses regenerasi sel dapat berlangsung cepat.

Tabel 3. Prosentase pertumbuhan kalus, respon eksplan, tipe dan warna kalus yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi konsentrasi BAP dan NAA

Perlakuan	Prosentase Pertumbuhan Kalus	Respon eksplan	Tipe kalus	Warna kalus/ eksplan
B_0N_0	*	+	*	kuning
B_0N_1	100%	+++	Kompak	kuning
B_0N_2	100%	+++	Kompak	kuning
B_1N_0	100%	+	Kompak	kuning
B_1N_1	100%	++	Remah	kuning
B_1N_2	100%	+++	Kompak	kuning
B_2N_0	100%	+	Remah	kuning
B_2N_1	100%	++	Remah	kuning
B_2N_2	100%	++	Remah	kuning
B_3N_0	100%	+	Remah	kuning
B_3N_1	100%	++	Remah	kuning
B_3N_2	100%	+++	Remah	kuning

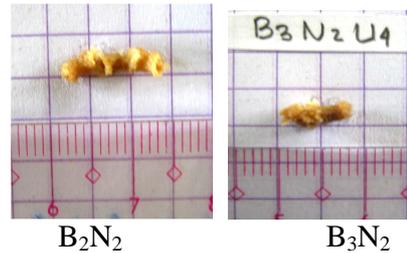
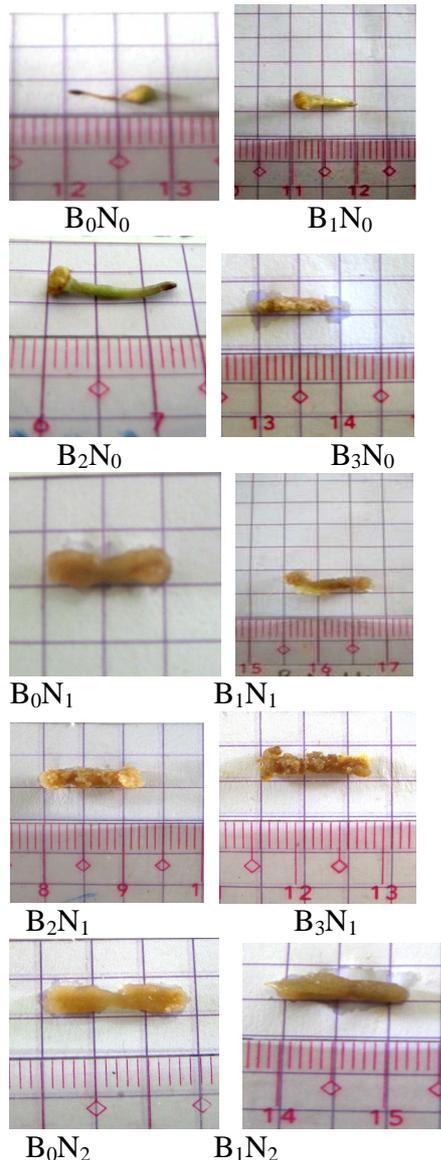
Keterangan: * berarti eksplan tidak membentuk kalus namun mengalami pembengkakan

B_0N_0 = BAP 0 ppm dan NAA 0 ppm, B_0N_1 = BAP 0 ppm dan NAA 1 ppm, B_0N_2 = BAP 0 ppm dan NAA 2 ppm, B_1N_0 = BAP 0,5 ppm dan NAA 0 ppm, B_1N_1 = BAP 0,5 ppm dan NAA 1 ppm, B_1N_2 = BAP 0,5 ppm dan NAA 2 ppm, B_2N_0 = BAP 1 ppm dan

NAA 0 ppm, B₂N₁ = BAP 1 ppm dan NAA 1 ppm, B₂N₂ = BAP 1 ppm dan NAA 2 ppm, B₃N₀ = BAP 1,5 ppm dan NAA 0 ppm, B₃N₁ = BAP 1,5 ppm dan NAA 1 ppm, B₃N₂ = BAP 1,5 ppm dan NAA 2 ppm.

(+) eksplan membengkak atau kalus hanya terbentuk di salah satu ujung eksplan, (++) kalus tumbuh pada sebagian permukaan eksplan (+++) kalus tubuh pada seluruh permukaan eksplan

Respon eksplan, tipe dan warna kalus juga dapat dilihat dari Gambar 3. di bawah ini:



Gambar 3. Respon eksplan, tipe dan warna kalus yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi konsentrasi BAP dan NAA

Keterangan: B₀N₀ = BAP 0 ppm dan NAA 0 ppm, B₀N₁ = BAP 0 ppm dan NAA 1 ppm, B₀N₂ = BAP 0 ppm dan NAA 2 ppm, B₁N₀ = BAP 0,5 ppm dan NAA 0 ppm, B₁N₁ = BAP 0,5 ppm dan NAA 1 ppm, B₁N₂ = BAP 0,5 ppm dan NAA 2 ppm, B₂N₀ = BAP 1 ppm dan NAA 0 ppm, B₂N₁ = BAP 1 ppm dan NAA 1 ppm, B₂N₂ = BAP 1 ppm dan NAA 2 ppm, B₃N₀ = BAP 1,5 ppm dan NAA 0 ppm, B₃N₁ = BAP 1,5 ppm dan NAA 1 ppm, B₃N₂ = BAP 1,5 ppm dan NAA 2 ppm.

Eksplan yang ditanam pada perlakuan B₀N₀ memberikan respon pertumbuhan yang rendah terhadap media. Hal tersebut ditandai dengan pertumbuhan eksplan yang hanya mengalami pembengkakan saja. Eksplan yang ditanam perlakuan selain B₀N₀ memberikan respon pertumbuhan yang baik dengan ditandai pembentukan kalus pada sebagian atau seluruh permukaan eksplan.

Kalus yang terbentuk dalam penelitian ini terdiri dari dua tipe, yaitu kalus remah dan kalus kompak. Tipe kalus menunjukkan variasi akibat perlakuan hormon yang berbeda. Media yang mengandung BAP 1 ppm dan 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 1 ppm atau 2 ppm umumnya akan membentuk kalus yang remah. Media-media dengan konsentrasi BAP 0 ppm dan 0,5 ppm akan menumbuhkan kalus yang kompak. Menurut Manuhara (2001), kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular dimana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh. Kalus kompak merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel berbentuk nodular, dengan struktur yang padat dan mengandung cukup banyak air.

Pengamatan yang dilakukan terhadap warna kalus menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk berwarna kuning. Warna kuning pada kalus diduga

merupakan pigmen antosantin (Evans *et al.*, 2003). Pigmen antosantin ini adalah senyawa fenol dari kelompok flavonoid. Senyawa fenol yang terbentuk pada kalus dalam penelitian ini merupakan bentuk respon eksplan terhadap luka. Luka pada kedua ujung hipokotil karena pengirisan akan memacu eksplan untuk melakukan usaha untuk pertahanan diri. Usaha tersebut dilakukan dengan meningkatkan aktifitas metabolik sehingga dihasilkan senyawa metabolit sekunder yaitu fenol. Jika fenol yang terbentuk mengalami oksidasi maka dapat menyebabkan warna coklat pada kalus (Pierik, 1987).

Senyawa fenol yang muncul pada kalus akan bersifat toksik bagi sel apabila dalam konsentrasi berlebihan, yang akan menghambat pertumbuhannya. Produksi senyawa fenol yang terbatas pada eksplan ataupun kalus masih dapat ditoleransi oleh eksplan, sehingga kultur masih dapat tumbuh. Namun apabila senyawa fenol sudah menyebabkan pencoklatan pada media tanam, hal ini dapat menghambat pertumbuhan eksplan yang mengakibatkan kematian kultur.

KESIMPULAN

Kalus dari eksplan hipokotil alfalfa (*Medicago sativa* L.) dapat diinduksi pada hampir semua perlakuan media. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh interaksi antara BAP dan NAA. Kalus yang optimal dihasilkan dari hipokotil yang ditumbuhkan pada media dengan pemberian kombinasi konsentrasi BAP 0 ppm dengan NAA 2 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

Allan, E. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture*. Wiley Publisher. Singapore.

Bhaskaran, S and R.H. Smith. 1990. Regeneration in Cereal Tissue Culture. *A Review Crop Science* 30: 1328-1336.

Catala, C., J. K. C. Rose, and A. B. Bennett. 2000. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins are Expressed During Early Tomato Fruit Growth-Plant *dalam* Aslamyah, S. 2002. Peranan Hormon Tumbuh dalam Memacu Pertumbuhan Algae. IPB. Bogor.

Chawla, H. S. 2003. *Plant Biotechnology Laboratory Manual for Plant Biotechnology*. Oxford & IBH Publishing. New Delhi.

De, K.K. and S. C. Roy. 1985. Morphogenetic Investigation on Pea Under In vitro Conditions. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 112 (4): (Abstract).

Hartman, H T., D E. Kester, and F T. Davies. 1997. *Plant Propagation Principle and Practicer Fifth edition*. Prentice-Hall international. New Jersey.

Hoesen, D. S. 2001. Perbanyakan dan Penyimpanan Kultur Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dengan Teknik *In vitro*. *Berita Biologi* 5 (4): 379-385.

Manuhara, Y.S.W. 2001. Regenerasi Tanaman Sawi (*Brassica juncea* L.var Morakot) Melalui Teknik Kultur Jaringan. *Jurnal MIPA Universitas Airlangga* 6 (2):127-130.

Peretty, P and S. Horne. 2007. Alfalfa *Medicago sativa*. *Natures Field* 23 (6): 1. <http://www.treelite.com/NF/2007/07/PetHealth.pdf>. 3 Juli 2008.

Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro Culture of Higher Plant*. Kluwer Academic Publisher. London.

Rahmayanti, E dan M. Sitanggang. 2006. Taklukkan Penyakit dengan Klorofil Alfalfa. PT Agromedium Pustaka. Jakarta.

Rel, S.I.G., E.G. Rel., Z. Kaya. 2001. Callus Development and Indirect Shoot Regeneration from Seedling *In Vitro* Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured. *Turkey Journal Botanical* 25: 25-33.

Smith, R.S. 1992. *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Academic Press, USA.

Sudarmadji. 2003. Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara *In vitro*. *Buletin Teknik Pertanian* 8 (1): 8-10.

Suryowinoto, M. 1996. Pemuliaan Tanaman Secara *In vitro*. Kanisius, Yogyakarta.

Syahid, S.F. dan N.N. Kristina. 2007. Induksi dan Regenerasi Kalus Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme* Lodd.) Secara *In vitro*. *Jurnal Littri* 13(4):142-146.

