

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Waktu Inisiasi Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur jaringan dengan teknik *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Pada penelitian ini, kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang kontak dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). Kalus yang dihasilkan melalui kultur secara *in vitro* terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon atau zat pengatur tumbuh. Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya (Gambar. 4.3)

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap waktu inisiasi Alfalfa. Sehingga, dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Lampiran 6, Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Pengaruh 2,4-D terhadap waktu inisiasi kalus (hari) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS

Konsentrasi 2,4-D	Waktu Inisiasi Kalus (hari)
0 mg/l	-
1 mg/l	6,35 a
2 mg/l	6,35 a
3 mg/l	6,35 a

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05. Dan tanda (-) berarti tidak tumbuh kalus.

Hasil uji DMRT α : 0,05 menunjukkan bahwa rata-rata waktu inisiasi kalus Alfalfa pada perlakuan 1 mg/l 2,4-D berbeda tidak nyata dengan 2 mg/l 2,4-D dan 3 mg/l 2,4-D yaitu, 6,35 hari. Sedangkan perlakuan 0 mg/l 2,4-D tidak tumbuh kalus.

Pemilihan zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan kalus tanaman yang dikulturkan. Asam dikloropenoksi asetat (2,4-D) merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang stabil untuk memacu proses didiferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukkan aktivitasnya yang lebih kuat. Aktivitas 2,4-D yang kuat dan optimal ini disebabkan karena gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon dan oksigen (Wattimena, 1988).

Mekanisme kerja 2,4-D dalam pembentukan kalus yaitu dengan berdifusi ke dalam jaringan tanaman yang telah dilukai. 2,4-D yang diberikan akan merangsang auksin yang terkandung di dalam jaringan eksplan menstimulasi pembelahan sel terutama sel-sel yang berada di sekitar daerah luka (Ulfa, 2011). Widiarti (2009) menyatakan bahwa auksin menginisiasi pemanjangan sel dengan cara mempengaruhi fleksibilitas dinding sel dan memacu protein tertentu yang ada di membran plasma untuk memompa ion H^+ ke dinding sel. Ion H^+ mengaktifkan enzim tertentu sehingga memutuskan ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Sel tumbuh memanjang akibat air yang masuk secara osmosis. Sel terus tumbuh dengan mensintesis kembali mineral dinding sel dan sitoplasma.

Penambahan air kelapa dalam media kultur Alfalfa (*Medicago sativa* L.) juga memberikan nutrisi yang cukup untuk membentuk kalus. Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi air kelapa tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,103$) terhadap waktu inisiasi kalus Alfalfa. Sehingga, tidak dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Lampiran 6).

Air kelapa dengan perlakuan tunggal tidak memberikan pengaruh terhadap waktu inisiasi. Hal dikarenakan konsentrasi air kelapa yang ditambahkan dalam media belum mampu menginduksi kalus secara optimum. Dalam penelitian kultur jaringan, air kelapa biasanya ditambahkan dalam media kultur untuk menggantikan peran BAP, yang merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin sintetik yang berfungsi untuk merangsang pembelahan sel. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa air kelapa mengandung air kelapa mengandung diphenil urea yang mempunyai aktivitas seperti sitokinin, yaitu mempunyai aktivitas pembelahan sel.

Berdasarkan hasil uji ANOVA tampak bahwa terdapat interaksi antara 2,4-D dan air kelapa dalam menentukan waktu inisiasi. Hasil uji lanjut Duncan 5% menunjukkan bahwa perlakuan A1D3 (10% air kelapa + 3 mg/l 2,4-D) mampu menginisiasi kalus dengan waktu yang cepat, yaitu 5,4 hari. Perlakuan A1D3 berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Waktu inisiasi kalus yang relatif lama terjadi pada eksplan yang ditumbuhkan pada media A1D0, A2D0 dan A3D0 (12,95-13,9 hari)

Tabel 4.2 Rata-rata waktu inisiasi kalus (hari) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dalam berbagai konsentrasi

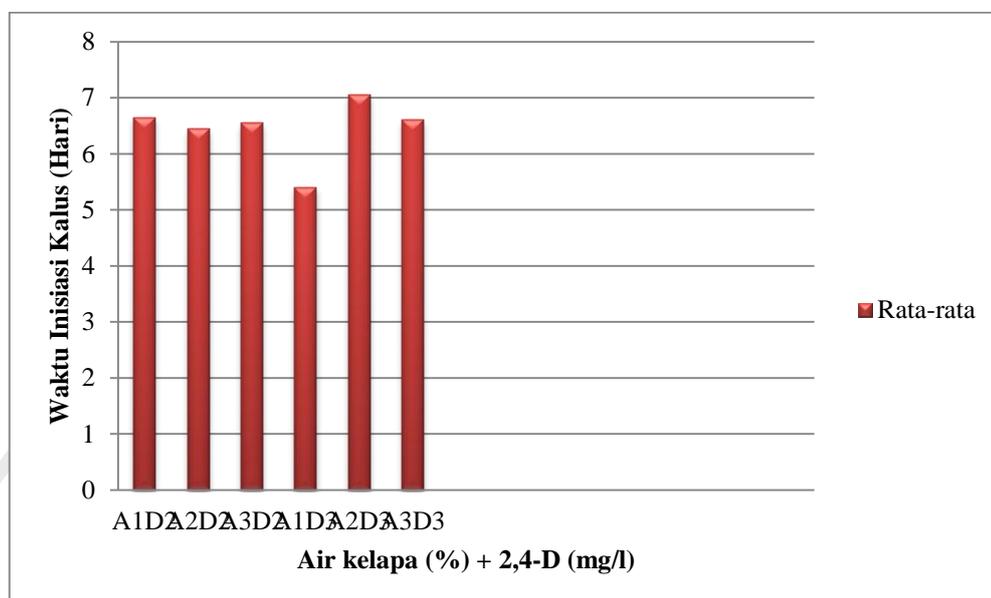
Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Air Kelapa (%)		
	A1 (10)	A2 (15)	A3 (20)
D0/0	-	-	-
D1/1	6,45 bc	6,4 bc	6,2 b
D2/2	6,65 bc	6,45 bc	6,55 bc
D3/3	5,4 a	7,05 c	6,6 bc

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05. Tanda (-) berarti kalus tidak tumbuh, sehingga tidak dilakukan uji DMRT.

Waktu inisiasi kalus dipengaruhi oleh interaksi kedua macam hormon yang ditambahkan pada media kultur, yaitu 2,4-D dan air kelapa. Eksplan yang ditumbuhkan pada perlakuan A1D0, A2D0 dan A3D0, yaitu tanpa pemberian 2,4-D tidak terbentuk kalus, hanya mengalami pembengkakan saja. 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.

Faktor lain yang menyebabkan waktu inisiasi kalus cukup lama yaitu karena penambahan air kelapa yang digunakan untuk mengganti peran BAP pada media kurang berpengaruh dalam memacu waktu inisiasi kalus, sehingga waktu inisiasi kalus berlangsung lambat. Kemungkinan lain yang menyebabkan waktu inisiasi relatif lama karena eksplan kotiledon Alfalfa memerlukan sitokinin jenis lain (bukan dari air kelapa) atau ZPT jenis lain untuk menginduksi pembentukan kalus. Hayati (2010) menyatakan bahwa kebutuhan ZPT sangat ditentukan oleh

jenis tanaman, artinya setiap tanaman membutuhkan jenis dan konsentrasi ZPT yang spesifik.



Gambar 4.1 Histogram rata-rata waktu inisiasi kalus (hari) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dengan berbagai konsentrasi.

Eksplan yang ditumbuhkan pada media A1D3 menunjukkan waktu inisiasi kalus tercepat, yaitu 5,4 hari. Kecepatan pertumbuhan yang terjadi pada eksplan dikarenakan adanya interaksi yang tepat antara hormon endogen eksplan dengan hormon eksogen yang ditambahkan. Keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan dalam media ini mengakibatkan proses fisiologis dalam eksplan dapat berlangsung efektif dalam memacu awal pertumbuhan kalus. Hal ini diperkuat oleh Gunawan (1988) dalam Urfiana, dkk (2013) yang menyatakan bahwa interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan ke dalam media dan yang diproduksi oleh tanaman secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. George dan Sherrington (1984) juga mengemukakan

bahwa pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh interaksi dan keseimbangan antara ZPT eksogen dan ZPT endogen (hormon).

Waktu inisiasi kalus pada perlakuan A1D1, A1D2, A2D3, A2D1, A2D2, A3D1, A3D2 dan A3D3 relatif sama, yaitu pada hari ke-6,2 dan 7,05. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi yang diberikan pada media cukup tepat dalam memacu waktu inisiasi kalus, walaupun waktu tersebut masih lama dibandingkan perlakuan A1D3 (10% air kelapa + 3 mg/l 2,4-D).

4.2 Berat Basah Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang *irreversible*, sehingga pengukuran berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus yang berasal dari eksplan kotiledon *Medicago sativa* L. Menurut Ruswaningsih (2007), berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat. Berat segar kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap berat basah kalus Alfalfa. Sehingga, dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Lampiran 6, Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Pengaruh 2,4-D terhadap berat basah kalus (gram) kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS

Konsentrasi 2,4-D	Berat Basah Kalus (gram)
0 mg/l	0,000000 a
1 mg/l	0,313267 c
2 mg/l	0,273133 bc
3 mg/l	0,248117 b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05

Hasil uji DMRT α : 0,05 menunjukkan bahwa rata-rata berat basah kalus Alfalfa pada perlakuan 2,4-D 2 mg/l tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2,4-D 3 mg/l, yaitu sebesar 0,27133 gram dan 0,248117 gram. Berat basah kalus terendah dihasilkan pada perlakuan 2,4-D 0 mg/l (tanpa 2,4-D). Sedangkan rata-rata berat basah kalus tertinggi dihasilkan pada perlakuan 2,4-D 1 mg/l.

Asam diklorofenoksi asetat (2,4-D) merupakan zat pengatur tumbuh golongan auksin yang berfungsi mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik tanaman. Hal ini sependapat dengan Gati dan Marisa (1992) yang menyatakan bahwa 2,4-D efektif untuk pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses didiferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus.

Kalus yang terbentuk dalam penelitian ini, dipengaruhi oleh adanya auksin dan sitokinin dengan perbandingan yang tepat dan sesuai akan mendukung pertumbuhan kalus. Di dalam sel, 2,4-D mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol sintesis protein, yang dilakukan pada proses transkripsi RNA (Maftuchah, dkk., 1998 dalam Rahayu, dkk. 2003). Kenaikan sintesis protein

menyebabkan bertambah sumber tenaga untuk pertumbuhan (Rahayu, dkk., 2003).

Penambahan air kelapa dalam media kultur Alfalfa (*Medicago sativa* L.) juga memberikan nutrisi yang cukup untuk membentuk kalus. Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi air kelapa tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,072$) terhadap berat basah kalus Alfalfa. Sehingga, tidak dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Lampiran 6).

Air kelapa tunggal tidak memberikan pengaruh terhadap berat basah kalus. Hal dikarenakan konsentrasi air kelapa tunggal yang ditambahkan dalam media belum mampu menginduksi kalus secara optimum. Dalam penelitian kultur jaringan, air kelapa biasanya ditambahkan dalam media kultur untuk menggantikan peran BAP, yang merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin sintetik yang berfungsi untuk merangsang pembelahan sel. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa air kelapa mengandung air kelapa mengandung diphenil urea yang mempunyai aktivitas seperti sitokinin, yaitu mempunyai aktivitas pembelahan sel.

Berdasarkan hasil uji ANOVA tampak bahwa terdapat interaksi antara 2,4-D dan air kelapa dalam menentukan berat basah kalus. Hasil uji lanjut Duncan 5% menunjukkan bahwa berat basah kalus tinggi dihasilkan dari eksplan yang ditumbuhkan pada media dengan perlakuan A1D2, A2D1, A3D1, A1D3, A2D3, dan A3D2, dengan berat basah kalus tertinggi terjadi pada perlakuan A3D1. Berat kalus yang terendah dihasilkan dari eksplan yang ditumbuhkan dari pada media A1D0, A2D0, A3D0, A1D1, A2D2, A1D3, dan A3D3, dengan berat basah kalus

terendah terjadi pada perlakuan kontrol tanpa 2,4-D (A1D0, A2D0, dan A3D0)

(Tabel 4.4)

Tabel 4.4 Rata-rata berat basah kalus (gram) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dalam berbagai konsentrasi

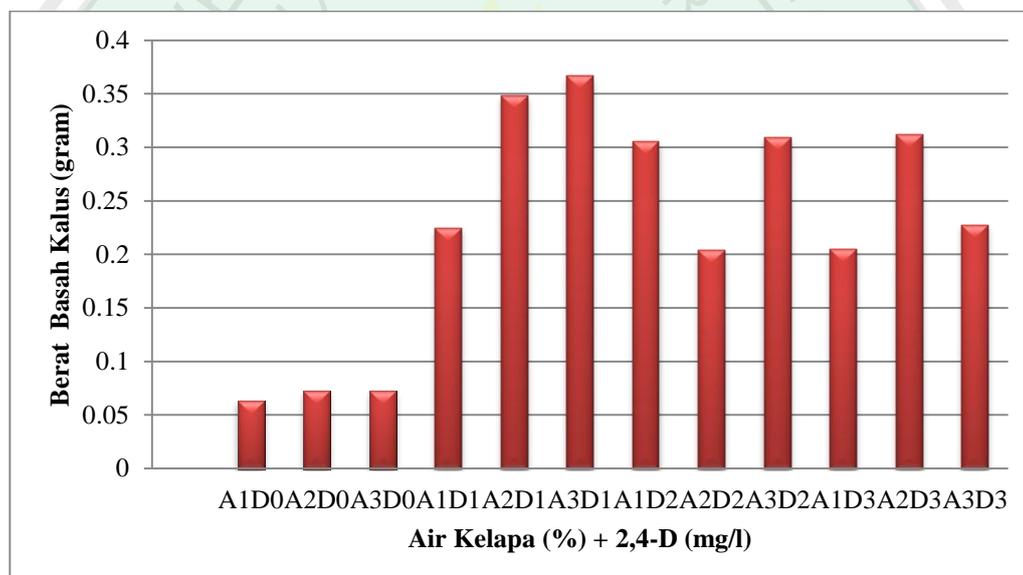
Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Air Kelapa (%)		
	A1 (10)	A2 (15)	A3 (20)
D0/0	0,000000 a	0,000000 a	0,000000 a
D1/1	0,224500 b	0,348550 c	0,366750 c
D2/2	0,305900 c	0,204000 b	0,309500 c
D3/3	0,205000 b	0,311850 c	0,227500 b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05

Eksplan yang ditumbuhkan pada media A1D0, A2D0, dan A3D0 yaitu media tanpa penambahan 2,4-D (kontrol) hanya mengalami pembengkakan. Hal ini dikarenakan komponen-komponen yang terdapat dalam media serta perbedaan taraf konsentrasi air kelapa (sebagai zat pengatur tumbuh organik) yang ditambahkan dalam media belum mampu menginduksi pembentukan kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara optimum. Eksplan dalam pertumbuhannya hanya dipacu oleh sukrosa, makronutrien, mikronutrien, dan vitamin terlarut dalam media serta hormon endogen yang ada dalam eksplan. Menurut Hoesen (2011), senyawa nitrogen dan rasio antara ammonium dengan nitrat yang terdapat terkandung dalam media MS dapat mempengaruhi terjadinya proses-proses didefernsiasi, pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Kultur kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan perlakuan A1D1, A2D2, A1D3 dan A3D3 menghasilkan berat basah kalus lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Berat basah kalus yang rendah terjadi

karena ukuran eksplan yang digunakan tidak seragam serta eksplan mengalami pertumbuhan yang relatif lama karena ketidakseimbangan konsentrasi 2,4-D dan air kelapa. Hal tersebut menunjukkan bahwa pembentukan kalus ditentukan oleh keseimbangan konsentrasi antara auksin dan sitokinin (Hayati, 2010). Guntoro (2013) menyatakan dalam penelitiannya bahwa perlakuan 2,4-D 1 mg/l dan air kelapa 15% yang ditambahkan pada media MS mampu menghasilkan berat basah kalus daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness). tertinggi, yaitu sebesar 0,08533 gram



Gambar 4.2. Histogram rata-rata berat basah kalus (gram) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dengan berbagai konsentrasi.

Media dengan perlakuan A3D1 mampu menghasilkan kalus dengan berat basah tidak berbeda nyata dengan perlakuan A1D2, A2D1, A2D3, dan A3D3 dan yaitu sebesar 0,366750 gram, sehingga dipilih perlakuan yang efisien untuk meningkatkan berat basah kalus, yaitu perlakuan A1D2 yang menghasilkan berat kalus sebesar 0,348850 gram. Hal tersebut dimungkinkan karena pemberian

konsentrasi air kelapa 15% dan 2,4-D 1 mg/l pada media menyebabkan keseimbangan konsentrasi antara auksin dan sitokinin eksogen dengan auksin dan sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan. Keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam kultur jaringan dengan teknik *in vitro* diketahui dapat memacu pembentukan kalus melalui interaksi dalam pembesaran sel (Allan, 1991).

Proses pembesaran sel terjadi karena pengaruh auksin. Auksin eksogen dalam hal ini 2,4-D 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 mengaktivasi 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 di antara 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 mengaktivasi 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 (Aslamsyah, 2002).

Sitokinin selanjutnya berperan memacu pembelahan dalam jaringan meristematik. Peran sitokinin secara langsung adalah dalam proses transkripsi dan translasi RNA dalam proses sintesis protein (Aslamsyah, 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 menghubungkan fragmen-fragmen DNA yang terputus-putus saat proses replikasi. Ketersediaan enzim-enzim ini di dalam sel akan menyebabkan proses pembelahan sel berlangsung lebih efektif (Stanfield, 2006 *dalam* Hayati, 2010).

Selain kandungan ZPT, air kelapa muda juga mengandung vitamin tanf beragam di antaranya thiamin dan piridoksin. Kandungan vitamin dalam air kelapa dapat dijadikan substansi vitamin sintetik yang terkandung pada media MS. Kandungan hara makro seperti N, P dan K, serta beberapa jenis unsur mikro dalam air kelapa muda juga berpeluang dikembangkan lebih lanjut sebagai upaya substansi unsur hara makro dan mikro serta sumber karbon, yakni sukrosa (Kristina dan Syahid, 2012).

Menurut Vilgliar (2006), konsentrasi garam mineral dan sukrosa air kelapa menurun seiring dengan bertambahnya umur dari 6-9 bulan. Di dalam air kelapa ditemukan 3 jenis gula, yakni glukosa komposisi 34-45%, sukrosa dari 53% sampai 18% dan fruktosa dari 12% -36%. Sukrosa mengalami penurunan konsentrasi seiring dengan pertambahan umur.

Nutrisi yang cukup banyak terutama unsur karbon dalam air kelapa mampu menunjang pertumbuhan eksplan Alfalfa (*Medicago sativa* L.) hingga membentuk kalus. Adanya interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa juga

menunjang pertumbuhan eksplan menjadi kalus. Interaksi yang paling efisien dalam hasil berat basah kalus adalah perlakuan 2,4-D 1 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 20% yakni sebesar 0,366750 gram.

4.3 Persentase Pertumbuhan dan Respon Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Hasil pengamatan terhadap persentase pertumbuhan kalus, menunjukkan bahwa pertumbuhan terjadi pada seluruh eksplan kotiledon Alfalfa yang ditumbuhkan pada 12 macam kombinasi perlakuan. Eksplan yang ditanam pada media A1D0, A2D0 dan A3D0 hanya mengalami pembengkakan saja, namun pada perlakuan lain semua eksplan mengalami dediferensiasi membentuk kalus. Pertumbuhan terjadi pada seluruh eksplan dimungkinkan, karena eksplan mempunyai respon yang baik terhadap media tanam (Gambar 4.3).

Eksplan kotiledon yang digunakan pada penelitian ini mempunyai umur yang masih muda dan kondisi yang sehat, karena eksplan diisolasi dari biji Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang dikecambahkan selama 7 hari secara aseptik dalam media MS tanda penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT). Menurut Rahayum (2003), media MS mempunyai konsentrasi garam organik yang lebih tinggi dibanding media lain. Hal ini diperkuat oleh George dan Sherington (1993) yang menyatakan bahwa media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM dalam bentuk NH_4^+ . Konsentrasi ini lebih besar dibandingkan dengan media-media lainnya. Hoesen (2011) menyatakan senyawa nitrogen dan rasio antara ammonium dengan nitrat yang terdapat dalam media MS dapat mempengaruhi terjadinya proses-proses dideferensiasi, pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Berdasarkan hal tersebut, biji yang dikecambahkan dalam media MS dan dalam kondisi aseptik, mengalami perkecambahan lebih cepat dan ukuran kotiledon lebih besar dibandingkan dengan biji yang dikecambahkan tidak dalam media MS.

Eksplan yang muda, sel-selnya bersifat meristematik, 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 jaringan secara *in vitro*, sehingga proses regenerasi sel dapat berlangsung cepat.

Tabel 4.5 Persentase pertumbuhan kalus, respon eksplan, tipe dan warna kalus yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi konsentrasi 2,4-D dan air kelapa

No	Perlakuan	Persentase Pertumbuhan Kalus	Respon Kalus	Tekstur Kalus	Warna Kalus
1	A1D0	*	+	*	Coklat
2	A2D0	*	+	*	Coklat
3	A3D0	*	+	*	Coklat
4	A1D1	100%	+++	Remah	Kuning
5	A2D1	100%	+++	Remah	Kuning
6	A3D1	100%	+++	Remah	Kuning
7	A1D2	100%	+++	Remah	Kuning
8	A2D2	100%	+++	Remah	Kuning
9	A3D2	100%	+++	Remah	Kuning
10	A1D3	100%	+++	Remah	Kuning
11	A2D3	100%	+++	Remah	Kuning
12	A3D3	100%	+++	Remah	Kuning

Keterangan : * : Eksplan tidak membentuk kalus namun mengalami pembengkakan
 (+) : Eksplan membengkak atau kalus hanya terbentuk di salah satu ujung eksplan
 (++) : Kalus tumbuh pada sebagian permukaan eksplan
 (+++) : Kalus tumbuh pada seluruh permukaan eksplan

A1D0 = 10% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A2D0 = 15% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A3D0 = 20% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A1D1 = 10% air kelapa dan 1

mg/l 2,4-D, A2D1 = 15% air kelapa dan 1 mg/l 2,4-D, A3D1 = 20% air kelapa dan 1 mg/2,4-D l, A1D2 = 10% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A2D2 = 15% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A3D2 = 20% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A1D3 = 10% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D, A2D3 = 15% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D, A3D3 = 20% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D.

Pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Pada awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air, sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel. Sel dapat melakukan aktivitas metabolik tersebut membutuhkan energi. Sukrosa yang ditambahkan dalam media, akan menjadi sumber energi sel-sel eksplan, sehingga sel dapat mengalami pembentangan dan pembelahan selanjutnya akan membentuk kalus (Sitorus, 2011).

Kultur kalus merupakan budidaya secara heterotrof. Sel tidak dapat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan karbon seperti halnya tanaman autotrof, sehingga sumber karbon harus diperoleh dalam bentuk karbohidrat yang ditambahkan dari luar. Gula merupakan sumber karbon sebagai pengganti karbon yang biasanya diperoleh dari atmosfer dalam bentuk CO₂ untuk bahan fotosintesis. Jika tidak ada sukrosa, maka aktivitas dan pertumbuhan kalus tidak dapat berlangsung dan pada akhirnya sel-sel tersebut akan mati (Sitorus, 2011).

Sukrosa yang ditambahkan dalam media berfungsi sebagai sumber karbon yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan (Kimbal, 1994). Glukosa akan mengalami penguraian melalui respirasi sel yang menghasilkan karbon dan energi. Energi ini akan digunakan oleh sel-sel eksplan untuk menutup luka yang terjadi dengan cara membentuk kalus. Pemberian

sukrosa dengan konsentrasi yang semakin meningkat akan menjamin ketersediaan sumber energi bagi sel untuk dapat tumbuh. Pada media dengan sukrosa yang konsentrasinya lebih kecil, sumber energinya akan lebih cepat habis seiring pertumbuhan sel, sehingga sel tidak dapat melakukan pertumbuhan lagi (Sitorus, 2011).

Sumber energi lain dalam media eksplan Alfalfa berasal dari air kelapa yang mengandung sukrosa, sukrosa maupun fruktosa dan penambahan gula pada media. Sehingga, media memiliki ketersediaan karbon yang cukup untuk nutrisi pertumbuhan eksplan Alfalfa.

Eksplan yang ditanam pada perlakuan A1D0, A2D0 dan A3D0 memberikan respon pertumbuhan rendah terhadap media. Hal tersebut ditandai dengan pertumbuhan eksplan yang hanya mengalami pembengkakan saja. Eksplan yang ditanam dalam media perlakuan selain perlakuan tersebut memberikan respon pertumbuhan yang baik dengan ditandai pembentukan kalus pada seluruh permukaan eksplan.

Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur (Budiyati, 2002). Pembentukan kalus dapat terjadi pada permukaan eksplan dan luka irisan, serta ditandai dengan pembengkakan pada eksplan dan munculnya binti-bintik berwarna putih. Hal ini diperkuat oleh Puspitasari dan Soegiharjo (2002) dalam penelitiannya yang menyatakan bahwa, proses terbentuknya kalus dimulai dari tonjolan kecil yang berada di tepi eksplan akan tumbuh kalus yang berwarna putih dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan eksplan.

4.4 Morfologi Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

4.4.1 Tekstur kalus

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur jaringan dengan teknik *in vitro* berupa tekstur kalus yang menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friabel*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak (Indah dan Dini., 2013).

Tekstur kalus yang terbentuk pada semua perlakuan yang diberikan adalah kalus dengan tekstur remah kecuali pada perlakuan A1D0, A2D0 dan A3D0 yang hanya mengalami pembengkakan (Tabel 4.4 dan Gambar 4.3). Menurut Manuhara (2011), kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular di mana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh. Pierik (1987) menyatakan bahwa tipe kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan kultur.

Eksplan Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam dalam media air kelapa (10%, 15%, dan 20%) tanpa penambahan 2,4-D tidak mampu menginduksi kalus secara optimum (hanya mengalami pembengkakan). Bahkan pada minggu ke empat pengamatan, eksplan yang ditanam dalam media tanpa 2,4-D mengalami

kemunduran fisiologis, yaitu mengalami kematian dan warna eksplan berubah menjadi coklat dan mulai membusuk. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan kalus hanya dipacu oleh nutrisi yang terdapat dalam media MS dan hormon endogen yang terdapat dalam eksplan serta konsentrasi air kelapa (mengandung sitokinin) yang ditambahkan dalam media belum mampu memacu pertumbuhan eksplan secara optimum. Sehingga, perlu ditambahkan zat pengatur tumbuh golongan auksin untuk memacu pertumbuhan kalus yang nantinya akan merangsang pembentukan tekstur kalus sesuai yang diharapkan.

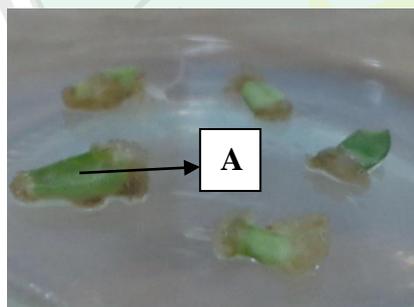
George (1993) dalam Dwi (2012) menyatakan bahwa kalus yang diinduksi dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur kompak daripada kalus yang dihasilkan tanpa induksi sitokinin. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat, sehingga sel menjadi lebih kaku. Sehingga penggunaan air kelapa sangat bermanfaat dalam pembentukan tekstur kalus.

Aktivitas sel selama pertumbuhan seperti pembelahan sel, penambahan volume, dan akhirnya terjadi proliferasi sel dapat ditingkatkan dengan pemberian zat pengatur tumbuh (Wardani, 2004). Peningkatan pembelahan sel oleh zat pengatur tumbuh dapat memacu laju pertumbuhan dan peningkatan biomassa kalus yang akhirnya dapat meningkatkan berat kalus (Azriati, 2010). Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media kemudian akan meningkatkan sintesis protein sebagai bahan baku penyusun enzim yang nantinya dapat memacu kerja enzim dalam proses metabolisme tubuh. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim

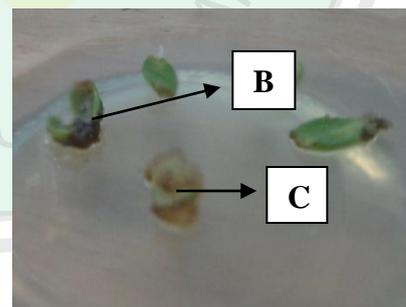
tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan serentetan reaksi-reaksi sekunder salah satunya adalah pembentukan metabolit sekunder.

4.4.2 Warna Kalus

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur jaringan dengan teknik *in vitro* berupa warna kalus yang menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder yaitu memiliki ciri-ciri warna yang sesuai dengan metabolit sekunder yang diinginkan. Pengamatan yang dilakukan terhadap warna kalus menunjukkan bahwa kalus terbentuk berwarna kuning dan coklat. Menurut Evans (2003) *dalam* Hayati (2010), warna kuning pada kalus diduga merupakan pigmen antosianin. Pigmen antosianin adalah senyawa fenol dari kelompok flavonoid.



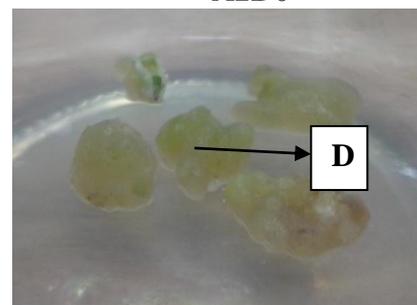
A1D0



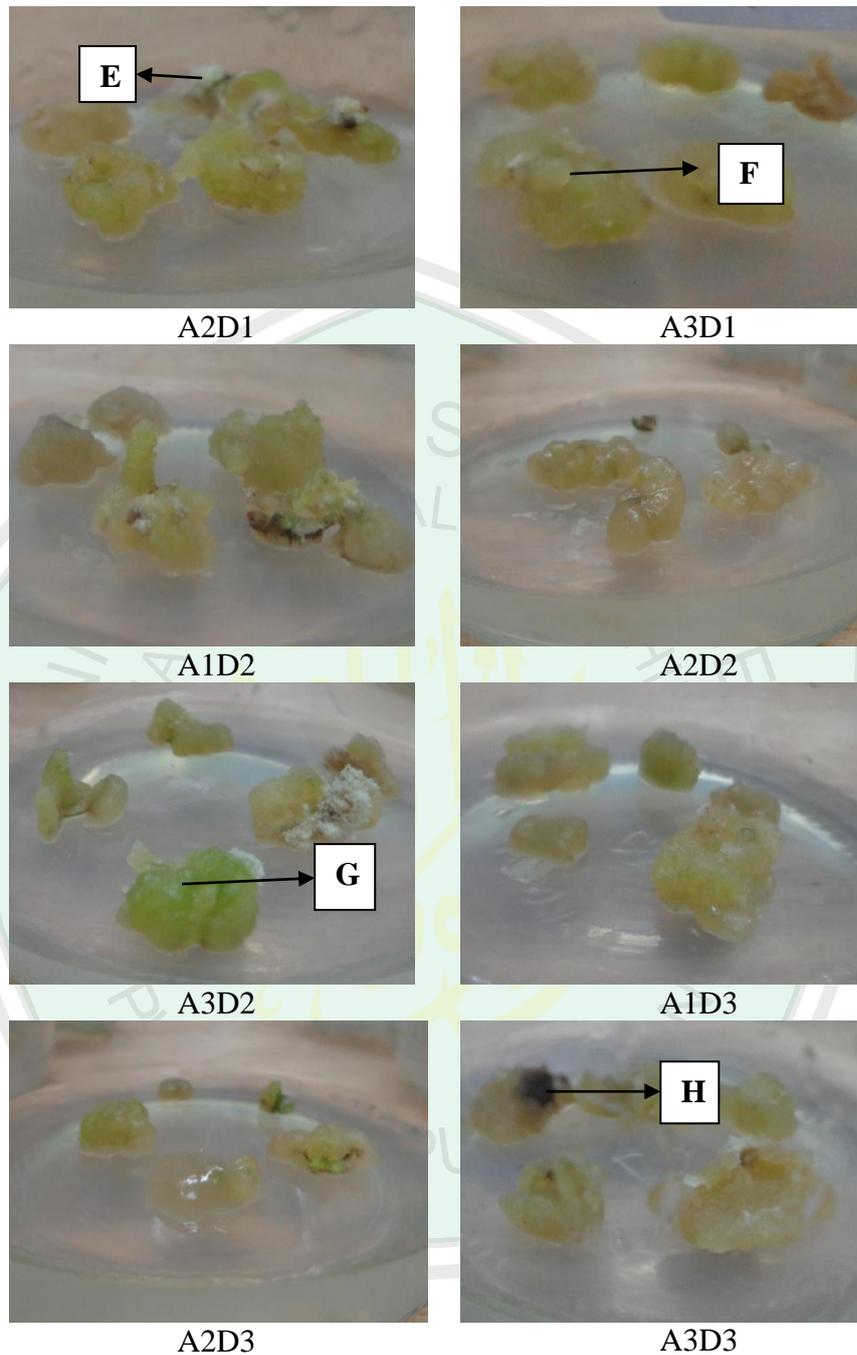
A2D0



A3D0



A1D1



Gambar 4.3 Respon eksplan, tipe dan warna kalus yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi konsentrasi 2,4-D dan air kelapa 30 HST (hari setelah tanam). A, B : Eksplan hanya mengalami pembengkakan dan berwarna coklat, C: Kalus mengalami penurunan fisiologis (mati), D: Kalus mengalami pigmentasi, warna kalus menjadi kecoklatan, E: Kalus mengalami kontaminasi (Bintik Putih), F: kalus berwarna kuning, G: Kalus berwarna hijau, H: Kalus mengalami *browning* (pencoklatan).

Keterangan: A1D0 = 10% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A2D0 = 15% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A3D0 = 20% air kelapa dan 0 mg/l 2,4-D, A1D1 = 10% air kelapa dan 1 mg/l 2,4-D, A2D1 = 15% air kelapa dan 1 mg/l 2,4-D, A3D1 = 20% air kelapa dan 1 mg/l 2,4-D, A1D2 = 10% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A2D2 = 15% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A3D2 = 20% air kelapa dan 2 mg/l 2,4-D, A1D3 = 10% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D, A2D3 = 15% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D, A3D3 = 20% air kelapa dan 3 mg/l 2,4-D.

Senyawa fenol yang terbentuk pada penelitian ini merupakan respon eksplan terhadap luka. Luka pada kedua kotiledon karena pengirisan akan memacu eksplan untuk melakukan usaha untuk pertahanan diri. Usaha tersebut dilakukan dengan meningkatkan aktivitas metabolik sehingga dihasilkan senyawa metabolit sekunder yaitu fenol. Jika fenol yang terbentuk mengalami oksidasi maka dapat menyebabkan warna coklat pada kalus (Pierik, 1987).

Hayati (2010) menyatakan bahwa 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.

Warna kalus kecoklatan terdapat pada perlakuan yang hanya diberikan air kelapa tanpa 2,4-D, baik air kelapa dengan konsentrasi 10%, 15% maupun 20%. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan (Andaryani, 2010). Rohmah (2007) menyatakan bahwa peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses

perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan.

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), kondisi warna kalus yang bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Ekplan yang berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi.

Proses perkembangan kalus mulai jelas terbentuk mulai minggu pertama pengamatan. Kalus mulai membesar berbentuk bulat dengan warna transparan, kemudian berkembang menjadi beberapa warna, yaitu hijau kekuningan, kuning hingga coklat. Pishesha (2008) menyatakan bahwa warna inti kalus yang dihasilkan dari pembentukan kalus yaitu putih dan hijau. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau, kuning, hingga coklat dengan bertambahnya umur.

Kalus yang terbentuk berawal dari bintik putih yang kemudian menjadi beberapa bintik putih hingga membentuk kalus. Sebagian bintik putih akan berubah menjadi kehijauan. Menurut Ariati (2012), kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki butir pati yang tinggi. Warna kalus mengidentifikasi keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin banyak pula kandungan klorofilnya dalam kalus (Dwi, 2012). Pembentukan warna kalus juga dipengaruhi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media inisiasi.

Rahayu (2003) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mempengaruhi penurunan kandungan klorofil dan karoten. Penurunan kandungan klorofil ini diduga terjadi karena pengaruh auksin pada metabolisme karbohidrat. Hal ini diperkuat oleh Mille (1995) yang menyatakan bahwa penggunaan 2,4-D pada tanaman dapat mengganggu metabolisme karbohidrat. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh karbohidrat yang merupakan zat pokoknya. Sehingga, apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga akan terganggu.

Kandungan sitokinin yang tinggi yang terdapat dalam air kelapa, mampu menghasilkan kalus berwarna hijau. Sehingga, interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa mampu membentuk kalus Alfalfa berwarna hijau. Menurut Wardani (2004) dalam Guntoro (2013), sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein. Namun, dengan bertambahnya umur kalus, kalus yang dihasilkan mengalami penuaan menjadi kuning hingga coklat sampai akhir pengamatan. Hal ini diperkuat oleh Palupi (2004) dalam Dwi (2012) yang menyatakan bahwa kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan (senensi) sel.

4.5 Kandungan Klorofil Total Kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Klorofil merupakan zat hijau daun yang terdapat pada semua tumbuhan hijau yang berfotosintesis. Pengukuran kandungan klorofil total kalus Alfalfa dilakukan setelah kalus berumur 30 hari dan dengan menggunakan spektrofotomer. Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap kandungan klorofil total kalus Alfalfa. Sehingga, dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Lampiran 6, Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Pengaruh 2,4-D terhadap kandungan klorofil total (mg/kg) kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS 30 HST

Konsentrasi 2,4-D	Kandungan klorofil total (mg/kg)
0 mg/l	0,0000 a
1 mg/l	$2,5 \times 10^4$ b
2 mg/l	$2,8 \times 10^4$ c
3 mg/l	$2,9 \times 10^4$ d

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT $\alpha: 0,05$

Hasil uji DMRT $\alpha: 0,05$ menunjukkan bahwa rata-rata kandungan klorofil kalus Alfalfa pada perlakuan 2,4-D 3 mg/l menghasilkan kandungan klorofil total tertinggi, yaitu sebesar $2,9 \times 10^4$ mg/kg. Sedangkan perlakuan 2,4-D 0 mg/l (tanpa 2,4-D) tidak tumbuh kalus, sehingga tidak dilakukan uji kandungan klorofil total.

Hasil analisis di atas menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D dalam media pada semua konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap kandungan klorofil total (Tabel 4.6). Secara visual hal ini juga dapat dilihat dari warnanya, Dengan meningkatnya konsentrasi auksin warna kalus semakin

menguning. Hal ini berkaitan dengan berkurangnya pigmen klorofil pada kalus. Fatmawati (2008) dalam Dwi (2012) menyatakan bahwa warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya.

Rata-rata pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kandungan klorofil tertinggi diperoleh pada perlakuan 3 mg/l 2,4-D yaitu $2,9 \times 10^4$ mg/kg, sedangkan nilai terendah kandungan klorofil total kalus pada perlakuan kontrol yaitu 0 mg/l. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mempengaruhi kenaikan kandungan klorofil.

2,4-D merupakan salah satu zat pengatur tumbuh golongan auksin yang berperan dalam proses induksi kalus. Gati dan Mariska (1992) menyatakan bahwa 2,4-D efektif untuk memacu pertumbuhan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dideferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Menurut Rahayu (2003), penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami.

Tabel 4.7 Pengaruh air kelapa terhadap kandungan klorofil total (mg/kg) kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS 30 HST

Konsentrasi Air Kelapa	Kandungan klorofil total (mg/kg)
10 %	$1,8 \times 10^4$ a
15 %	$2,1 \times 10^4$ b
20 %	$2,2 \times 10^4$ c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi air kelapa memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap kandungan klorofil total kalus Alfalfa. Sehingga, dilanjutkan dengan uji DMRT 5%. Hasil uji DMRT $\alpha: 0,05$ menunjukkan bahwa rata-rata kandungan klorofil kalus Alfalfa pada perlakuan air kelapa 20% menghasilkan kandungan klorofil total tertinggi, yaitu sebesar $2,2 \times 10^4$ mg/kg. Sedangkan perlakuan terendah diperoleh pada perlakuan air kelapa 10% dengan kandungan klorofil total sebesar $1,8 \times 10^4$ mg/kg.

Kandungan vitamin dalam air kelapa muda cukup beragam, di antaranya thiamin dan piridoksin. Selain kandungan ZPT, kandungan vitamin dalam air kelapa dapat dijadikan substansi vitamin sintetis yang terkandung pada media MS. Kandungan hara makro seperti N, P, dan K, serta beberapa jenis unsur mikro dalam air kelapa muda juga berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai upaya substitusi unsur hara makro dan mikro serta sumber karbon, yakni sukrosa (Kristina dan Syahid, 2012).

Sukrosa merupakan salah satu sumber karbon yang dapat mempengaruhi sintesis klorofil. Rahayu (2003) menyatakan bahwa sintesis klorofil dipengaruhi oleh kandungan yang merupakan zat pokoknya yaitu karbohidrat. Apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga terganggu. Vigliar (2006) menyatakan bahwa di dalam air kelapa ditemukan 3 jenis gula, yakni glukosa dengan komposisi 34-45%, sukrosa dari 53% sampai 18% dan fruktosa dari 12-36%.

Kandungan klorofil total kalus pada pemberian air kelapa 20% menghasilkan kandungan klorofil total tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi air kelapa yang ditambahkan dalam media, maka semakin tinggi kandungan klorofil total kalus yang dihasilkan. Semakin banyak sukrosa yang ditambahkan dalam media, hasil proses sintesis klorofil kalus semakin banyak.

Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara 2,4-D dan air kelapa dalam menentukan kandungan klorofil total kalus. Hasil uji lanjut Duncan 5% menunjukkan bahwa kandungan klorofil kalus tinggi diperoleh pada perlakuan A3D3 yaitu sebesar $3,1 \times 10^4$ mg/kg. Sedangkan kandungan klorofil total kalus terendah diperoleh pada perlakuan kontrol (tanpa penambahan 2,4-D) sebesar 0,0000 mg/kg.

Tabel 4.8 Rata-rata kandungan klorofil total (mg/kg) kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dalam berbagai konsentrasi

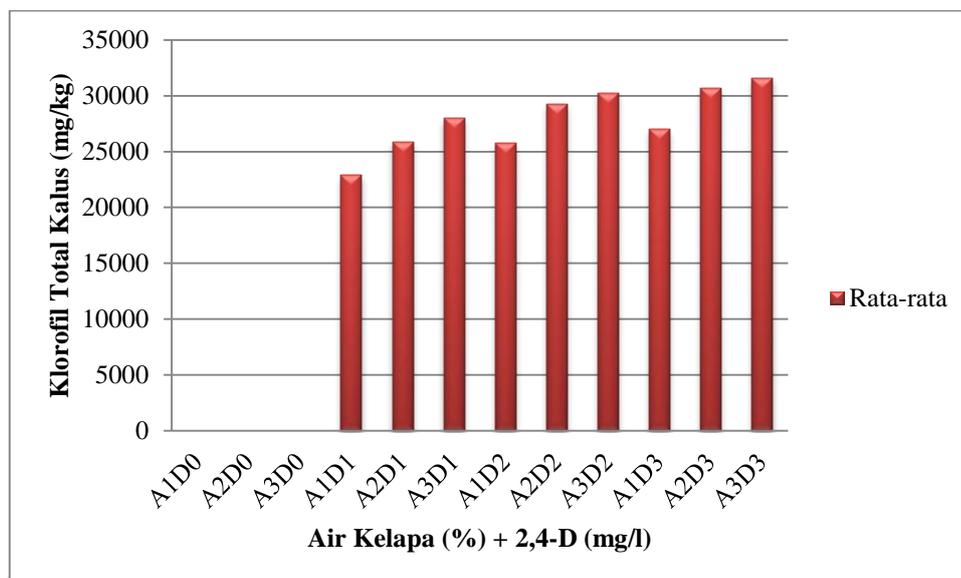
Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Air Kelapa (%)		
	A1 (10)	A2 (15)	A3 (20)
D0/0	0,0000 a	0,0000 a	0,0000 a
D1/1	$2,2 \times 10^4$ b	$2,5 \times 10^4$ c	$2,7 \times 10^4$ e
D2/2	$2,5 \times 10^4$ c	$2,9 \times 10^4$ f	$3,02 \times 10^4$ g
D3/3	$2,6 \times 10^4$ d	$3,0 \times 10^4$ g	$3,1 \times 10^4$ h

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil tidak berbeda nyata sedangkan yang disertai huruf yang tidak sama menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan hasil uji DMRT α : 0,05

Eksplan yang ditumbuhkan pada media A1D0, A2D0, dan A3D0 yaitu media tanpa penambahan 2,4-D (kontrol) hanya mengalami pembengkakan kalus sehingga tidak dilakukan analisis kandungan klorofilnya. Hal ini dikarenakan komponen-komponen yang terdapat dalam media serta perbedaan taraf

konsentrasi air kelapa (sebagai zat pengatur tumbuh organik) yang ditambahkan dalam media belum mampu menginduksi pembentukan kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara optimum.

Kultur kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan perlakuan A1D1, A1D2, A1D3, A2D1, A2D2, A2D3 dan A3D2 menghasilkan kandungan klorofil kalus total terendah dibandingkan dengan perlakuan A3D3. Kandungan klorofil total kalus yang rendah terjadi karena ketidakseimbangan konsentrasi 2,4-D dan air kelapa yang ditambahkan dalam media serta karena kalus sudah mengalami kemunduran sehingga mempengaruhi warna kalus yang berdampak pada berkurangnya kandungan klorofil total kalus. Hal tersebut menunjukkan bahwa sintesis klorofil kalus ditentukan oleh keseimbangan konsentrasi antara auksin dan sitokinin serta warna kalus. Pernyataan tersebut sesuai dengan penelitian Setyaningrum (2010) yang menyatakan bahwa pemberian kombinasi ZPT auksin dan sitokinin dalam media dapat mempengaruhi kandungan klorofil total kalus Alfalfa. Pada perlakuan 1 mg/l 2,4-D dengan 2,5 mg/l kinetin mampu menghasilkan klorofil total kalus Alfalfa tertinggi, yaitu sebesar 4,148 mg/l.



Gambar 4.4 Histogram rata-rata kandungan klorofil kalus (mg/kg) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang ditanam pada media MS dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan air kelapa dengan berbagai konsentrasi.

Media A3D3 (20% air kelapa + 3 mg/l 2,4-D) mampu menghasilkan klorofil total kalus tertinggi, yaitu sebesar $3,16 \times 10^4$ mg/kg dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal tersebut dimungkinkan karena pemberian konsentrasi air kelapa 20% dan 2,4-D 3mg/l pada media menyebabkan keseimbangan konsentrasi antara auksin dan sitokinin eksogen dengan auksin dan sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan. Keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam kultur jaringan dengan teknik *in vitro* diketahui dapat meningkatkan kandungan klorofil total kalus (Setyaningrum, 2010).

Sintesis klorofil (Gambar 4.5 Grimmer, 1990) diawali dengan pembentukan asam α aminolevulinat (ALA). Pembentukan ALA melalui jalur glutamat yaitu melalui tahapan pembentukan glutamat t-RNA dari glutamat kemudian diubah menjadi semialdehid selanjutnya menjadi α ketogluraldehid

untuk kemudian dengan enzim transaminase atau enzim amino transferase terbentuklah ALA. Dari 2 molekul ALA dengan melibatkan enzim ALA dehidrasase akan terbentuk porfobilinogen (PBG) yang mengandung cincin pirol dari 4 molekul PBG dengan melibatkan enzim uroporfirinogen III. Setelah terbentuk porfobilinogen kemudian terbentuk hidroksimetilbilane. Pembentukan Hidroksimetilbilan pada biosintesis klorofil dimana porfobilinogen akan berikatan dengan bantuan enzim hidroksimetilbilan sintetase. Hidroksimetilbilan akan membentuk uroporfirinogen III dengan bantuan enzim uroporfirinogen III sintetase. Uroporfirinogen III dekarboksilase dan H₂O mengubah uroporfirinogen III di bawah kondisi aerob membentuk caproporfirinogen III. Selanjutnya akan membentuk proporfirinogen IX. Oksidasi terhadap Proporfirinogen IX akan menghasilkan proporfirinogen IX yang belum memiliki Mg. Protoforfirin IX kemudian bergabung dengan Mg²⁺ dan H₂O akan membentuk Mg-protoporifin IX dengan bantuan enzim Mg-chelatae. Penambahan gugus metil pada Mg-protoporifin IX dengan bantuan Mg-protoporofin IX metiltransferase akan membentuk Mg-protoporifin IX monometil ester. Selanjutnya adalah perubahan Mg-protoporifin IX monometil ester menjadi protoklorofilidae (Grimm, 1990).

Perubahan protochlorofilidae menjadi klorofil a terjadi melalui terbentuknya protochlorofilde holocrome yang berikatan dengan protein ion 2H⁺. Dua ion tersebut disumbangkan pada cincin keempat sehingga terbentuklah protoklorofilidae a holocrome, yang selanjutnya dapat berubah menjadi klorofil a dengan melepaskan holocrome bersama apoprotein. Dua klorofil a dengan bantuan enzim klorofilase yang mengkatalisis esterifikasi senyawa fitol akan

terbentuk klorofil a. Pembentukan klorofil b dimungkinkan dari klorofil a yang mengalami oksidasi gugus metil pada cincin keduanya menjadi gugus aldehid ataupun dimungkinkan dari senyawa porifirin yang dapat diubah menjadi klorofil a maupun klorofil b (Grimm, 1990)

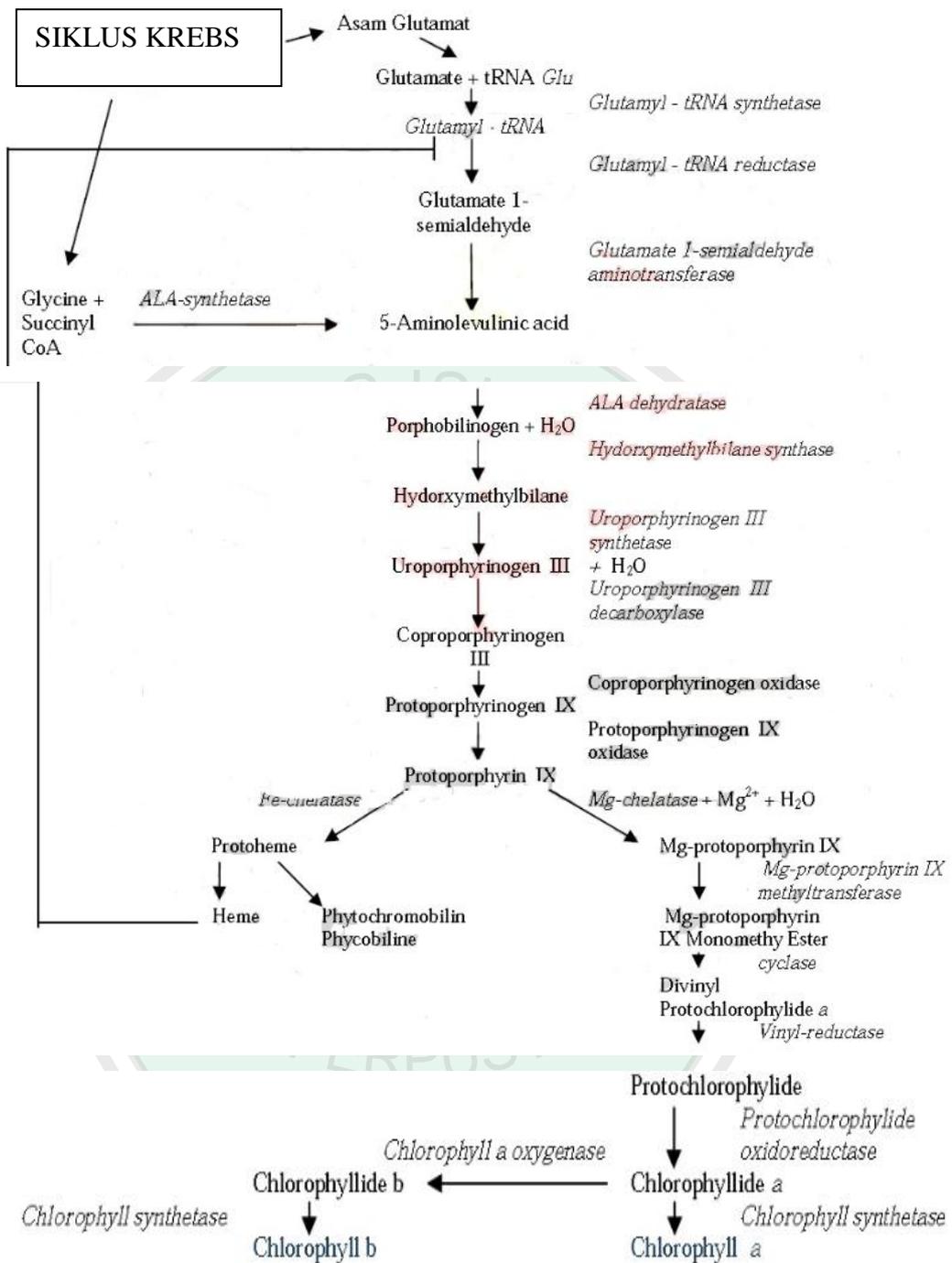
Berdasarkan dari proses sintesis klorofil di atas dapat diketahui bahwasanya, salah satu bahan utama yang diperlukan dalam proses fotosintesis adalah Magnesium (Mg). Hal ini diperkuat oleh Subandi (2008) yang menyatakan bahwa faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan klorofil antara lain gen, cahaya, dan unsur N, Mg, Fe sebagai pembentuk dan katalis dalam sintesis klorofil. Menurut Kristina dan Syahid (2012), Air kelapa muda mengandung magnesium sebanyak 9,11 mg/100 ml. Dengan penambahan air kelapa konsentrasi 20% pada media kultur dapat meningkatkan suplai magnesium yang dibutuhkan dalam proses sintesis klorofil. Sehingga klorofil total yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan media yang ditambahkan dengan air kelapa dengan konsentrasi rendah (konsentrasi 10%).

Media MS merupakan media yang sering digunakan dalam media kultur jaringan tumbuhan. Menurut Gunawan (1992), media MS memiliki kandungan N dalam jumlah tinggi dalam bentuk nitrit dibandingkan jenis media lainnya. Selain itu dalam media MS juga terkandung unsur hara lengkap dan diperkaya oleh vitamin dan hormon. Dengan penggunaan media MS sebagai media kultur, maka akan membantu proses sintesis klorofil Alfalfa secara optimum.

Selain beberapa faktor di atas, yang dibutuhkan dalam proses sintesis klorofil yaitu sukrosa yang merupakan sumber karbon dalam proses sintesis

klorofil. Semakin banyak konsentrasi sukrosa yang ditambahkan dalam media kultur, maka dapat memacu kenaikan kadar klorofil kalus. Rahayu (2003) menyatakan bahwa sintesis klorofil dipengaruhi oleh kandungan yang merupakan zat pokoknya yaitu karbohidrat. Apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga terganggu





Gambar 4.5 Mekanisme Pembentukan Klorofil
(Sumber: Grimm, 1990)

4.6 Perlakuan Pertumbuhan Tanaman Menurut Islam

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa perlakuan beberapa konsentrasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kandungan klorofil total kalus Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada media MS. Pertumbuhan kalus dapat dilihat dari segi kuantitas dan kualitasnya. Kuantitas kalus meliputi, waktu inisiasi kalus, berat kalus, dan persentase tumbuh kalus. Sedangkan kualitas kalus meliputi, tekstur dan warna kalus.

Waktu inisiasi kalus tercepat (5,4 hari) diperoleh pada perlakuan A1D3 (10% air kelapa dengan 3 mg/l 2,4-D. Berat basah kalus tertinggi (0,348850 gram) diperoleh pada perlakuan A1D2 (10% air kelapa dengan 2 mg/l 2,4-D). Sedangkan persentase tumbuh kalus secara maksimal diperoleh pada semua perlakuan dengan penambahan 2,4-D dengan persentase tumbuh sebesar 100%. Tekstur kalus berbentuk remah dan kalus berwarna kuning diperoleh pada semua perlakuan dengan penambahan 2,4-D. Sedangkan kandungan klorofil total kalus tertinggi ($3,16 \times 10^4$ mg/kg) diperoleh pada perlakuan A3D3 (20% air kelapa + 3 mg/l 2,4-D).

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat diketahui bahwasanya dengan berbagai macam perlakuan yang telah diberikan berakibat pada pertumbuhan kalus serta kandungan klorofil kalus yang meningkat. Hasil tersebut menunjukkan kepada kita bahwasanya Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang hidup dari biji dan benih yang merupakan benda mati atau dari bagian tanaman yang mati.

Selain itu, dari hasil penelitian tersebut juga menunjukkan pada kesempurnaan kekuasaan, keindahan, dan kebijaksanaan Allah SWT yang tergambar melalui tumbuhan. Para ahli genetika mengungkapkan bahwa “pada asal makhluk hidup ada kehidupan, setiap yang tumbuh, dari jenis biji maupun benih, mempunyai kehidupan yang tersimpan. Dia-lah (Allah) yang menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang segar dari biji yang kering dan mengeluarkan yang kering dari tumbuh-tumbuhan yang hidup dan tumbuh.

Perkembangan eksplan Alfalfa (*Medicago sativa* L.) menjadi kalus ditunjukkan dari beberapa perlakuan yang telah dilakukan. Kotiledon aseptik alfalfa yang merupakan eksplan dalam penelitian ini, awalnya belum mempunyai kehidupan. Eksplan mulai nampak tumbuh dan berkembang pada hari tertentu setelah tanam. Atas kehendak Allah eksplan kotiledon Alfalfa mampu tumbuh. eksplan yang awalnya hanya berupa potongan-potongan kotiledon yang diletakkan dalam media tanam dengan komposisi nutrisi serta adanya zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media, atas kuasa Allah eksplan tumbuh dengan baik. Pembentukan kalus diawali dengan adanya pembengkakan pada permukaan eksplan karena adanya luka irisan ataupun sayatan. Eksplan yang ditanam akan menunjukkan tanda-tanda kehidupan lebih lanjut dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil yang berada di tepi eksplan yang nantinya akan tumbuh kalus yang berwarna putih dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan eksplan.

Pertumbuhan merupakan peristiwa pembelahan dan pembesaran sel. Pertumbuhan menunjukkan proses perubahan secara kuantitatif berupa

penambahan jumlah sel, ukuran sel, lebar serta berat dari organisme yang sedang mengalami pertumbuhan. Tumbuhan bertambah panjang karena adanya perubahan volume serta berat basah atau kering yang merupakan perubahan secara kuantitatif. Parameter pertumbuhan sangat bervariasi dan bersifat kuantitatif.

Firman Allah SWT dalam QS. Al-Insyiqaaq ayat 19, yang berbunyi:

لَتَرْكَبُنَّ طَبَقًا عَن طَبَقٍ ﴿١٩﴾

Artinya: "Sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan) (QS. Al-Insyiqaaq:19)

Kata *thobaqo* memiliki arti tingkat demi tingkat (Yang dimaksud dengan tingkat demi tingkat ialah dari setetes air mani sampai dilahirkan, kemudian melalui masa kanak-kanak, remaja dan sampai dewasa. dari hidup menjadi mati kemudian dibangkitkan kembali). Dalam konteks tumbuhan kalimat tersebut dapat diartikan bahwa segala sesuatu itu tidak langsung berkembang menjadi dewasa, semuanya mengalami beberapa pertumbuhan. Kalus terbentuk karena adanya eksplan yang berasal dari jaringan meristematik yang mengalami luka, karena adanya zat pengatur tumbuh auksin yang menyebabkan sel pada eksplan tersebut mengalami pemanjangan sel yang tidak diikuti pembelahan sel. Sehingga, menyebabkan terbentuknya kalus. Setelah kalus terbentuk maka kalus tersebut beregenerasi menjadi embrio kemudian tumbuh dan berkembang menjadi tanaman dewasa (*planlet*).

Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid. Lima fase pertumbuhan kalus, yaitu: (1) Fase lag, di mana sel-sel mulai

membelah, (2) Fase eksponensial, di mana laju pertumbuhan sel berada pada puncaknya, (3) Fase linier, pembelahan sel mengalami pertumbuhan perlambatan tetapi ekspansi sel meingkat, (4) Fase deselerasi, laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun, dan (5) Fase stasioner, di mana laju jumlah dan ukuran sel tetap.

