



EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* DAN REGENERASI PLANLET DARI TIGA VARIETAS ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

In Vitro Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration of Three Varieties of Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Sulastri*, Winda Nawfetrias, Djatmiko Pinardi, Henti Rosdayanti

Pusat Teknologi Produksi Pertanian, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Gedung 610, LAPTIAB-BPPT, Kawasan Puspiptek, Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314

*E-mail: sulastri@bppt.go.id

ABSTRACT

Alfalfa (Medicago sativa L.) is a valuable plant as a source of food for animal, forage, pharmaceutical, medicine, food supplement, and human consumption. In vitro selection technology combined with induction or spontaneous mutagenesis has been effective in altering or isolating genetic variability for desirable characters. Consequently, a reproducible in vitro propagation technique of that plant is mandatory. The aim of the research was to obtain information on the embryogenic callus induction, somatic embryogenesis, and plantlet regeneration of three varieties of alfalfa. The results showed that an optimum embryogenic callus induction (82%) was obtained on Murashige & Skoog (MS) basal medium containing 2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2 ppm kinetin and 2 ppm α -naphthaleneacetic acid (NAA). Those embryogenic calli could subsequently develop into somatic embryos, which germinated and regenerated into normal plantlets on R1 medium consisting of MS nutrients without the addition of plant growth regulator.

Keywords: alfalfa, callus, embryogenic, plantlets, regeneration

ABSTRAK

*Alfalfa (Medicago sativa) adalah tanaman berharga sebagai sumber makanan untuk hewan, yaitu hijauan pakan ternak, farmasi, obat-obatan, suplemen makanan dan konsumsi manusia. Teknologi seleksi *in vitro* yang dikombinasikan dengan induksi atau mutagenesis spontan telah terbukti efektif dalam mengubah atau mengisolasi variabilitas genetik untuk karakter yang diinginkan. Oleh sebab itu, keberhasilan teknik perbanyakan *in vitro* yang telah terbukti dapat direproduksi dari tanaman tersebut menjadi syarat yang harus terpenuhi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi mengenai induksi kalus embriogenik, embriogenesis somatik dan regenerasi planlet dari tiga varietas alfalfa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus embriogenik optimal (82%) didapat pada media Murashige & Skoog (MS) dengan 2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2 ppm kinetin dan 2 ppm α -naphthaleneacetic acid (NAA). Kalus embriogenik tersebut dapat membentuk embrio somatik, embrionya berkecambah dan beregenerasi membentuk planlet normal pada perlakuan media R1 yaitu nutrisi MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh.*

Kata Kunci: alfalfa, embriogenik, kalus, planlet, regenerasi

PENDAHULUAN

Tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) adalah tanaman legum yang mempunyai peranan penting dalam penyediaan hijauan pakan ternak yang murah dengan nilai gizi dan pencernaan tinggi yang banyak ditanam secara luas di seluruh dunia. Nama alfalfa berasal dari bahasa Arab yang artinya bapak dari segala tanaman, bahkan disebut juga "Ratu Hijauan (*The Queen of Forage Crops*)" (Lacefield et al. 2011). Alfalfa tergolong sumber hijauan pakan ternak yang potensial dimanfaatkan untuk ternak ruminansia karena produksinya tinggi serta didukung nilai nutrisi yang baik dengan kandungan protein kasar berkisar 17,7–24,1% (Sirait et al. 2010). Manfaat alfalfa selain sebagai pakan ternak yang kandungan mineral, vitamin dan proteinnya tinggi, juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan suplemen atau obat kesehatan bagi manusia. Salah satu suplemen makanan yang telah banyak dikonsumsi adalah *liquid chlorophyll* berbahan dasar klorofil daun alfalfa (Mardaningsih et al. 2012). Tanaman alfalfa juga berfungsi sebagai tanaman konservasi yaitu untuk penghijauan, pengontrol erosi dan untuk rotasi tanaman. Pengenalan dan penanaman alfalfa di Indonesia diharapkan dapat mengatasi permasalahan pengembangan peternakan terutama di lahan kering, dan juga untuk meningkatkan pengembangan industri-industri berbasis protein hewani serta industri pakan. Luas areal penanaman alfalfa sampai saat ini masih sangat terbatas dan benih masih diimpor dari luar negeri.

Studi mengenai alfalfa telah banyak dilakukan, seperti studi mengenai ketahanan terhadap hama, penyakit, kemasaman dan kadar garam tinggi, namun belum banyak studi mengenai ketahanan terhadap kekeringan, terutama untuk daerah tropis. Penelitian alfalfa pada berbagai tahapan dalam kultur jaringan seperti kultur embrio, protoplas dan pada level DNA juga telah banyak dilakukan untuk menyeleksi sifat-sifat tertentu yang diinginkan dari keragaman yang ada. Walaupun banyak studi mengenai alfalfa di berbagai negara, namun penelitian alfalfa belum banyak dilakukan dan dikembangkan di Indonesia. Kajian pembentukan kalus embriogenik alfalfa dan regenerasinya ini diharapkan

nantinya dapat digunakan sebagai bahan awal untuk pembentukan alfalfa tropis toleran kekeringan yang dapat dibudidayakan dan dikembangkan secara luas di Indonesia. Ketersediaan sistem regenerasi *in vitro* alfalfa akan sangat diperlukan dalam program pemuliaan khususnya melalui teknik rekayasa genetika untuk mendapatkan bibit unggul alfalfa yang dapat berproduksi dan berkembang di daerah tropis dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan. Kajian pemuliaan tanaman alfalfa melalui teknologi rekayasa genetika akan memerlukan eksplan yang mampu membentuk tunas atau embrio somatik secara efisien sebagai target kajiannya. Oleh karena itu, teknik embriogenesis perlu dikembangkan untuk memperoleh informasi sistem regenerasi *in vitro* yang stabil yang akan diperlukan baik untuk bahan seleksi genetik maupun untuk perbanyakan rutin varietas unggul hasil seleksi dalam pengembangannya nanti (Utsumi et al. 2017).

Kultur *in vitro* telah banyak terbukti dapat digunakan untuk menyediakan bibit tanaman secara *massal* dan cepat. Perbanyakan tanaman menggunakan teknik kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik (Ibrahim et al. 2013). Organogenesis artinya proses terbentuknya organ-organ seperti pucuk atau tunas dan akar. Inisiasi organogenesis berasal dari diferensiasi sel somatik khususnya sel meristem yang berada pada titik tumbuh (Tyas et al. 2016). Eksplan sel meristem yang berada pada titik tumbuh jika ditanam dalam medium regenerasi yang tepat dapat langsung membentuk tunas, yang kemudian akan disusul oleh pembentukan akar, sehingga terbentuk tanaman secara utuh. Pada proses organogenesis tersebut zat pengatur tumbuh (ZPT) sitokinin bersama-sama dengan auksin berperan aktif dalam pembentukan tunas. Organogenesis lebih dipilih dalam aplikasi perbanyakan klonal karena memungkinkan untuk abrasi kromosom (Mattjik 2005). Embriogenesis adalah proses terbentuknya embrio somatik. Embrio somatik adalah embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi dari sel tubuh tanaman. Embrio somatik biasanya berasal dari sel tunggal yang kompeten dan berkembang membentuk fase *globuler*, hati, torpedo, dan akhirnya menjadi embrio somatik dewasa yang siap dikecambahkan

membentuk planlet/ tanaman utuh (Rose dan Song 2017). Embriogenesis somatik pada tanaman mempunyai beberapa tahapan perkembangan yang spesifik, seperti induksi kalus embriogenik atau embrio somatik (pembentukan langsung), pemeliharaan, pendewasaan, perkecambahan, pembentukan kotiledon, bibit somatik dan aklimatisasi (Mohamadi-Nasab et al. 2011; Indah dan Ermavitalini 2013; Bhatia dan Bera 2015).

Beberapa faktor penting yang mempengaruhi induksi kalus dan regenerasi tanaman yaitu pemilihan jenis eksplan, genotipe dan suplemen media yang digunakan, serta jenis dan kuantitas ZPT. Genotip tanaman dan komposisi nutrisi merupakan faktor utama dalam induksi kalus embriogenik (Sah et al. 2014). Penelitian pada tahap ini dilakukan dalam rangka untuk mendapatkan informasi mengenai kultur *in vitro* alfalfa yang akan digunakan sebagai bahan dalam kegiatan pembentukan dan pengembangan alfalfa tropis toleran kekeringan. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk (1) mendapatkan komposisi media induksi kalus embriogenik alfalfa (2) mengetahui eksplan terbaik untuk mendapatkan kalus embriogenik, (3) mendapatkan komposisi media untuk regenerasi planlet alfalfa.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian, LAPTIAB BPPT Kawasan Puspiptek, Setu, Tangerang Selatan. Waktu penelitian dilakukan pada 2010-2011 untuk tahap penelitian tentang induksi kalus dan pembentukan embrio somatik, dan berlanjut dari Februari-Oktober 2016 untuk tahap penelitian tentang regenerasi planlet.

Sumber eksplan

Bahan tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang digunakan ada tiga genotipe alfalfa yang berbeda yaitu: alfalfa asal Taiwan yang ditanam oleh PT. Greenfield dan petani-petani di Malang (V1= Alfalfa Taiwan); alfalfa heirloom vernal yaitu jenis alfalfa *wild type* yang diperoleh dari produsen benih di Amerika (V2=Alfalfa heirloom vernal), dan alfalfa jenis yang biasa digunakan untuk salad, berasal dari Amerika (V3=Alfalfa untuk salad).

Induksi kalus embriogenik

Biji alfalfa disterilisasi dengan dicelupkan dalam alkohol 70% selama 30 detik, kemudian dengan NaOCl 1,05% selama 30 menit dan dicuci dengan akuades steril 3-4 kali. Biji kemudian ditanam di media MS (Murashige dan Skoog 1962) tanpa pemberian ZPT. Eksplan yang dipakai untuk pembentukan kalus embriogenik meliputi batang, daun dan akar kultur *in vitro* tanaman alfalfa umur 7-14 hari yang dipotong-potong menjadi berukuran 5-10 mm. Potongan eksplan tersebut kemudian ditumbuhkan pada media perlakuan induksi kalus sehingga membentuk kalus embriogenik. Subkultur dari eksplan ke media yang sama dilakukan setiap empat minggu sebanyak dua kali subkultur. Komposisi media induksi kalus yang digunakan yaitu media dasar MS dengan variasi penambahan ZPT sebagai berikut: AL1 (MS + 2 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 2 ppm kinetin + 2 ppm α -naphthaleneacetic acid (NAA)); AL2 (MS + kinetin 2 ppm + indole butyric acid (IBA) 2 ppm) dan AL3 (MS + 2 ppm 2,4-D + 0,25 ppm kinetin). Media dasar MS yang digunakan terdiri dari garam-garam mineral MS ditambah dengan 3% sukrosa, 100 ppm mio-inositol dan vitamin MS, yaitu 0,1 ppm tiamin-HCl, 0,5 ppm piridoksin-HCl, 0,5 ppm asam nikotinat dan 2 ppm glisin. Semua media yang digunakan diatur pH-nya menjadi 5,8 menggunakan KOH atau HCl sebelum ditambah dengan pematat media. Pematat media yang digunakan adalah bubuk agar-agar sebanyak 15 gram per liter media. Media yang sudah diberi pematat dididihkan dan dimasukkan ke dalam botol kultur berkapasitas 100 mL sebanyak 30 mL per botol. Sterilisasi media dalam botol-botol kultur dilakukan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit.

Kultur diinkubasikan di dalam ruang kultur yang bersuhu rata-rata 26±2°C. Selama periode induksi kalus embriogenik, kultur diinkubasikan dalam kondisi 24 jam gelap. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali (10 botol), dimana setiap botol terdiri atas 5 eksplan, sehingga untuk masing-masing perlakuan dikulturkan sebanyak 50 eksplan. Pengamatan dilakukan setelah kultur berumur 4-8 minggu setelah tanam (MST). Peubah yang diukur adalah jumlah eksplan yang membentuk kalus embriogenik.

Pembentukan embrio somatik

Kalus embriogenik alfalfa yang telah mengalami dua kali subkultur selanjutnya di regenerasikan pada media perlakuan untuk pembentukan embrio, pematangan embrio, perkecambahan embrio dan regenerasi planlet yaitu media MS dengan variasi penambahan ZPT sebagai berikut:

- (1) R1 (MS tanpa penambahan ZPT)
- (2) R2 (MS + 0,5 ppm BAP (6-Benzylaminopurine) + 0,005 ppm NAA + 1 ppm ethynill estradiol)
- (3) R3 (MS + 0,5 ppm BAP + 0,005 ppm NAA)

Perkembangan embrio, pematangan dan perkecambahan embrio somatik alfalfa dilakukan dalam ruang kultur yang diberi penyinaran selama 24 jam dengan intensitas penyinaran 1000-1500 luks, pada suhu 26±2°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

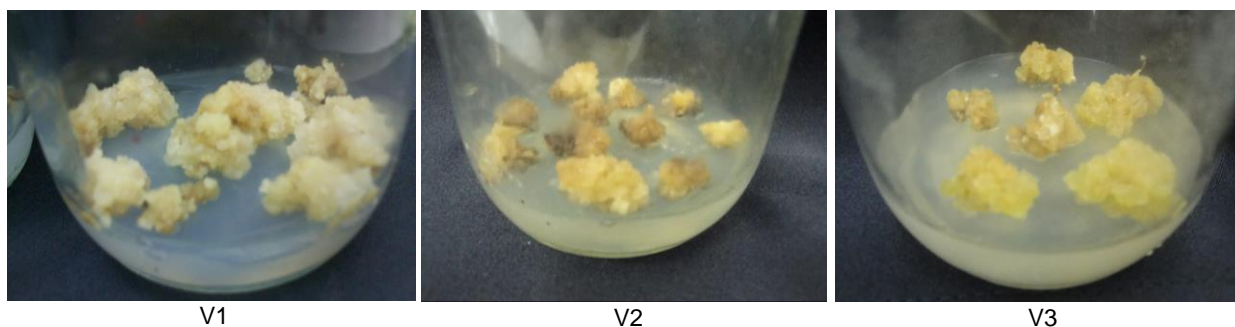
Pengaruh komposisi media dan genotipe alfalfa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada media A11 pertumbuhan kalus embriogenik alfalfa adalah yang paling baik, yang ditunjukkan dengan terbentuknya kalus embriogenik yang bertekstur lebih remah dibandingkan media A12 dan A13. Kalus embriogenik yang terbentuk pada media A11 berwarna putih kekuningan, remah dan mudah hancur (Gambar 1). Pada media A12 dan A13 dihasilkan kalus yang kompak, padat dan sebagian lembek serta berair. Kalus yang baik memiliki tekstur yang remah (*friable*), seperti yang disampaikan oleh Lizawati (2012) yaitu bahwa tekstur kalus yang remah dianggap baik karena dapat meningkatkan aerasi oksigen antar sel dan mudah dipisahkan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, sedangkan kalus yang

Tabel 1. Nilai rata-rata pembentukan kalus alfalfa (%) pada media dan genotipe alfalfa berbeda (V1= Alfalfa Taiwan, V2= Alfalfa heirloom vernal, V3=Alfalfa untuk salad)

Genotipe alfalfa	Media		
	A11	A12	A13
V1	89	61	63
V2	76	57	37
V3	81	62	55

memiliki tekstur kompak umumnya memiliki ukuran sel yang kecil dengan sitoplasma yang padat, mempunyai inti sel yang besar dan butir pati (kandungan karbohidrat) yang banyak. Kalus yang remah memiliki kemampuan beregenerasi menjadi planlet 12 kali lebih efektif dibandingkan kalus yang kompak (Devi et al. 2015). Pada media A11 yang mengandung 2,4-D; kinetin dan NAA memberikan hasil induksi kalus embriogenik yang paling baik diantara ketiga komposisi media yang digunakan. Hal ini ditunjukkan dengan presentase kalus embriogenik yang terbentuk pada media A11 baik untuk alfalfa V1, V2 maupun V3 memberikan nilai tertinggi (Tabel 1). Penggunaan media yang tepat dalam memperoleh kalus embriogenik sangat ditentukan oleh komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D yang tinggi dapat menginduksi pembentukan kalus dan embrio somatik pada beberapa jenis tanaman (Mohamadi-Nasab et al. 2011; Jan et al. 2015; Islam et al. 2017). Namun pada penelitian ini, pada media A13 yang mengandung 2,4-D, yaitu kombinasi 2 ppm 2,4-D dan 0,25 ppm kinetin menghasilkan persentase kalus embriogenik yang tidak maksimal, yaitu dibawah nilai pada media



Gambar 1. Kalus embriogenik alfalfa genotipe Alfalfa Taiwan (V1), Alfalfa heirloom vernal (V2) dan Alfalfa untuk salad (V3) pada media A11

Tabel 2. Pembentukan kalus (%) pada eksplan dan genotipe alfalfa berbeda

Genotipe alfalfa	Eksplan		
	Batang	Daun	Akar
V1	64,33 ^b	72,8 ^a	61,6 ^b
V2	65,33 ^b	54,33 ^c	54,33 ^c
V3	73,067 ^a	64,53 ^b	51,8 ^c

Keterangan: Nilai yang ditandai huruf yang sama pada kategori yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan 5%

Al1. Induksi kalus embriogenik biasanya dipicu oleh penambahan auksin, terutama yang sintetik seperti 2,4-D dan penggunaan 2,4-D tanpa penambahan ZPT lainnya dilaporkan lebih baik dalam menghasilkan kalus embriogenik dibandingkan kombinasi dengan auksin atau sitokinin lainnya (Shahsavari et al. 2010; Zhao et al. 2011; Pawar et al. 2015). Auksin dan sitokinin merupakan faktor penentu pembentukan kalus embriogenik karena sangat penting peranannya dalam pengaturan siklus pembelahan sel selama pembentukan kalus embriogenik (Verma et al. 2016).

Genotipe alfalfa V1 cenderung memberikan hasil persentase pembentukan kalus yang paling tinggi untuk ketiga komposisi media apabila dibandingkan dengan genotipe alfalfa yang lain. Untuk mendapatkan komposisi media induksi kalus alfalfa yang optimum pada masing-masing genotipe alfalfa perlu dilakukan pengujian, karena tidak diketahui secara pasti apakah potensi embriogenesis tiap genotipe akan stabil pada berbagai kondisi kultur, atau bahwa kondisi kultur yang digunakan merupakan kondisi yang sesuai dan cocok untuk genotipe tertentu. Selain itu antara penelitian yang satu dengan yang lain juga bisa mendapatkan hasil yang berbeda walaupun menggunakan genotipe dan komposisi media yang sama (*nonreproducible*) (Mohamadi-Nasab et al. 2011; Sah dan Kaur 2013). Namun menurut Rose dan Song (2017), alfalfa merupakan salah satu legume yang genotipe antar spesiesnya sesuai dan relatif memberikan respon yang sama dalam pembentukan kalus embriogenik. Berdasarkan hal tersebut maka seharusnya antara V1, V2 dan V3 tidak

Tabel 3. Hasil skoring warna dan kualitas kalus varietas V1, V2 dan V3 pada umur 4 MST pada media Al1

Eksplan	Warna kalus	Kualitas kalus
Alfalfa V1= Alfalfa Taiwan:		
batang	4,2 ^a	4,2 ^a
daun	4,0 ^a	4,0 ^a
akar	4,0 ^a	4,0 ^a
Alfalfa V2= Alfalfa heirloom vernal:		
batang	4,0 ^a	3,9 ^a
daun	4,0 ^a	4,0 ^a
akar	3,1 ^b	3,1 ^b
Alfalfa V3= Alfalfa untuk salad:		
batang	3,7 ^{ab}	3,9 ^a
daun	3,5 ^{ab}	3,8 ^a
akar	3,0 ^b	3,0 ^b

Keterangan: Skoring warna kalus: 1: mati (hitam); 2: coklat kehitaman; 3: krem kecoklatan; krem (putih kekuningan); 5: bening atau kuning kehijauan Skoring kualitas kalus: 1: tidak terbentuk kalus; 2: kalus lembek dan berair; 3: kalus pejal; 4: kalus friable; 5: kalus friabel, ukuran lebih dari 5 mm

memberikan perbedaan respon yang nyata dalam induksi pembentukan kalus.

Pengaruh jenis eksplan embriogenik

Hasil pengujian induksi kalus dari berbagai jenis eksplan memberikan hasil seperti yang disajikan pada Tabel 2. Eksplan daun pada alfalfa varietas V1 memberikan hasil yang paling baik dalam tingkat pembentukan kalus yaitu sebanyak 72,8%, sedangkan pada varietas V2 dan V3 persentase pembentukan kalus terbaik pada eksplan batang yaitu masing-masing 65,33% dan 73,067%. Menurut Jeyakumar dan Vivekanandan (2015) tipe dan struktur eksplan memegang peranan penting dalam pembentukan kalus dan pada beberapa tanaman, eksplan daun memberikan hasil yang lebih baik dalam pengujian induksi kalus dibandingkan eksplan batang (*internode*).

Warna kalus juga dapat menjadi indikator kualitas kalus embriogenik (Mohajer et al. 2012). Menurut Bustami (2011), kalus dengan warna hijau kekuningan menunjukkan gejala penuaan sel. Kalus berwarna putih dan kehijauan merupakan kalus yang dapat disubkultur lagi, sementara yang berwarna kecoklatan selanjutnya akan

mengering dan mati. Hasil pengamatan kualitas kalus didasarkan pada struktur kalus yang terbentuk, yaitu kalus yang remah atau friabel menunjukkan pertumbuhan kalus yang paling bagus. Secara umum kualitas kalus tidak ada perbedaan yang nyata diantara kalus yang terbentuk dari eksplan organ batang, daun dan akar pada alfalfa V1, V2 maupun V3. Eksplan batang dan daun relatif memberikan respon yang lebih bagus dibandingkan eksplan akar dalam pembentukan kalus embriogenik, yang dicirikan dari penampakan kalus yang berwarna bening/putih kekuningan dan mempunyai struktur yang remah (Tabel 3). Menurut Wiedenfeld et al. (1997), kalus embriogenik dengan struktur remah dan berwarna bening yang dihasilkan dari perbanyakan kalus pada umumnya banyak mengandung air. Selanjutnya Van Harten (1998) menyatakan bahwa material yang banyak mengandung air ini akan memudahkan terjadinya ionisasi dalam penggunaan sinar radiasi sehingga akan lebih efektif dalam menghasilkan keragaman. Sehingga informasi ini sangat berguna untuk pemuliaan alfalfa, dimana induksi mutasi melalui sinar radiasi dilakukan untuk mendapatkan keragaman somaklonal alfalfa.

Pengaruh komposisi media

Dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro*, keberhasilan dalam menginduksi dan memperbanyak kalus embriogenik harus pula diikuti oleh keberhasilan perkembangan embrio somatik, perkecambahan embrio dan regenerasi embrio somatik menjadi planlet. Perkecambahan embrio somatik merupakan proses yang kompleks, dan dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya faktor genotipe, tipe eksplan, keseimbangan zat pengatur tumbuh, serta kondisi fisiologi kalus embriogenik. Pengujian perkecambahan embrio somatik dan regenerasi planlet menggunakan media R1 (media MS tanpa penambahan ZPT), kalus dapat membentuk embrio somatik yaitu ditandai dengan terbentuknya struktur lengkap dengan kotiledon dan radikula (Gambar 2). Embrio somatik yang telah masak dikecambahkan terus dalam media yang sama. Setelah satu bulan embrio somatik yang telah masak mengalami pemanjangan epikotil dan lebih kurang 1 bulan kecambah mulai membentuk akar dan daun primer. Kecambah yang

Tabel 4. Nilai rata-rata regenerasi (%) kalus embriogenik tiga varietas alfalfa pada media dan genotipe alfalfa berbeda

Genotipe alfalfa	Media		
	R1	R2	R3
V1 (Alfalfa Taiwan)	81,3	2,3	2,3
V2 (Alfalfa heirloom vernal)	78,3	2,6	1,1
V3 (Alfalfa untuk salad)	80,6	1,3	0,6

ditanam selanjutnya dapat berkembang menjadi planlet, yang ditandai dengan semakin memanjangnya epikotil, terbentuknya akar dan daun baru. Selanjutnya dihasilkan tanaman alfalfa yang normal dengan daun, batang dan akar. Persentase terbentuknya planlet normal pada media R1 ini mencapai 80% (Tabel 4), sedangkan 20% lainnya menunjukkan pertumbuhan tidak normal, yang ditandai dengan tidak berkembangnya kotiledon, terbentuknya daun yang lebar dan tunas yang *vitreous*.

Kalus embriogenik yang dipindah ke media R2 (MS + 0,5 ppm BAP + 0,005 ppm NAA + 1 ppm *ethynill estradiol*) tidak membentuk embrio somatik dan tidak mengalami pembesaran ukuran kalus. Sedangkan kalus embriogenik yang dikecambahkan pada media R3 (MS + 0,5 ppm BAP + 0,005 ppm NAA) terjadi perubahan yaitu kalus membesar, kompak dan berubah warna menjadi hijau, namun tidak terjadi perkecambahan (Gambar 4). Perbedaan respon pertumbuhan kalus embriogenik dengan penambahan sitokinin dan auksin ditunjukkan oleh struktur kalus yang terbentuk atau derajat kekompakan dan keremahan dari kalus hal ini karena auksin dan sitokinin berpengaruh dalam kecepatan proses pembelahan, pemanjangan dan diferensiasi sel (Benítez-García et al. 2015). Pembentukan embrio somatik dari kalus embriogenik pada umumnya mensyaratkan penurunan konsentrasi auksin pada media atau bahkan sering terjadi dengan pemindahan kalus embriogenik ke media tanpa ZPT. Pemberian ZPT di media R2 dan R3 mungkin akan dapat memacu perkecambahan embrio somatik apabila embrio somatik sudah terbentuk. Pemindahan kalus embriogenik ke media regenerasi dengan penambahan BAP dan NAA kemungkinan tidak memberi

kesempatan terbentuknya embrio somatik, sehingga tahapan selanjutnya yaitu pematangan embrio, perkecambahan dan regenerasi menjadi planlet normal tidak terjadi di media R2 dan R3. Penambahan *ethynil estradiol* pada media R2 dimaksudkan untuk meningkatkan daya regenerasi kalus

embriogenik. *Ethynil estradiol* adalah hormon estrogen sintetik. Hasil penelitian Ehsanpour dan Taheri (2005), menunjukkan bahwa dengan penambahan 1 ppm ethynil estradiol pada media kultur dapat memacu pertumbuhan pucuk, akar dan embrio somatik kalus alfalfa. Namun kalus



(A)



(B)

Gambar 2. Perkecambahan kalus embriogenik (A) dan regenerasi planlet alfalfa (B) pada media R1



(A)



(B)

Gambar 3. Perkembangan kalus embriogenik pada media R2 yang tidak berkecambah (A) dan yang berkecambah sebagian (B)



(A)



(B)

Gambar 4. Perkembangan kalus embriogenik pada media R3 yang tidak berkecambah (A) dan yang berkecambah (B)

embriogenik pada media R2 tetap tidak menunjukkan adanya perkecambahan, kalus tumbuh membesar dan kompak serta berubah warna menjadi hijau. Hal ini kemungkinan disebabkan karena embrio somatik belum terbentuk pada media R2 tersebut.

Pembentukan sel atau kalus embriogenik adalah syarat utama dalam produksi embrio somatik. Kalus embriogenik umumnya diperoleh dari embrio benih atau jaringan yang meristematik. Kultur kalus memiliki potensial morfogenetik yang bervariasi. Kalus yang diperoleh seringkali gagal beregenerasi membentuk embrio somatik atau hanya mampu membentuk akar. Untuk proses pembentukan embrio somatik, pematangan dan perkecambahan serta regenerasi planlet membutuhkan medium, ZPT serta lingkungan yang memadai. Sebelum dilakukan induksi pembentukan embrio somatik, kadang kala dilakukan pemecahan kalus untuk dikulturkan ke media yang baru dengan tujuan untuk meningkatkan pembelahan sel. Tetapi subkultur kalus yang berulang dapat menyebabkan sel kehilangan kemampuan morfogenetiknya. Kalus yang diperoleh dari hasil inisiasi awal akan memiliki kemampuan untuk beregenerasi membentuk embrio somatik yang tinggi dibandingkan kalus hasil subkultur. Oleh karena itu, proses subkultur kalus sangat penting diperhatikan untuk memastikan pertumbuhan dan perkembangan kalus yang baik. Subkultur kalus yang dilakukan tidak benar dapat menyebabkan kematian jaringan secara bertahap (Nakasha et al. 2016).

Perkecambahan embrio somatik dan perkembangannya menjadi planlet merupakan fase kritis dalam keberhasilan regenerasi planlet (Kumar et al. 2016). Pada medium R3 yang mengandung NAA dan BAP kalus embriogenik berubah warna menjadi hijau dan membesar yang menandakan terjadinya diferensiasi sel, namun tidak beregenerasi. Hal ini bertentangan dengan beberapa hasil penelitian yang menyatakan bahwa BAP akan memberikan hasil yang baik untuk perkecambahan kalus dan pembentukan tunas apabila dikombinasikan dengan NAA pada kalus embriogenik tanaman kedelai (Islam et al. 2017). Sitokinin dalam hal ini BAP berperan dalam perkembangan dan pembentukan meristem saat pembentukan primordium pucuk dalam

perkecambahan embrio. Dengan penambahan kinetin dapat meningkatkan proliferasi dan regenerasi kalus dengan mempengaruhi mitosis, sitokinesis, sintesis total protein, biosintesis lignin, diferensiasi vaskular dan diferensiasi dalam pematangan kloroplas dari protoplastid (Sankepally dan Singh 2016). Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini maka perlu dilakukan percobaan untuk media induksi kalus embriogenik, pembentukan embrio, dan media perkecambahan dan regenerasi planlet dengan penambahan auksin dan sitokinin pada dosis yang tepat untuk memaksimalkan regenerasi planlet dari kalus embriogenik alfalfa seperti dengan penambahan kinetin, 2,4-D, NAA dan BAP.

KESIMPULAN

Induksi kalus embriogenik alfalfa yang paling efektif adalah pada media A11 dengan komposisi media dasar MS dan penambahan ZPT 2,4-D, kinetin dan NAA masing-masing 2 ppm. Pembentukan embrio somatik, pematangan embrio, perkecambahan embrio dan regenerasi planlet alfalfa terbaik didapatkan dengan pemindahan kalus embriogenik ke media MS tanpa penambahan ZPT. Namun untuk mengoptimalkan presentase regenerasi planlet perlu dibuat kajian tiga jenis media, yaitu media induksi kalus embriogenik, media embryogenesis yaitu untuk pembentukan embrio, dan media perkecambahan dan regenerasi planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Benítez-García I, Vanegas-Espinoza PE, Meléndez-Martínez AJ, Heredia FJ, Paredes-López O, Del Villar-Martínez AA (2015) Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Elect J Biotechnol* 17:107-113. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.01.004
- Bhatia S, Bera T (2015) Somatic embryogenesis and organogenesis. Pp 209-230. In: Bhatia S, Sharma K, Dahiya R, Bera T (Eds). *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Elsevier, Amsterdam. doi: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00006-6

- Bustami MU (2011) Penggunaan 2,4-D untuk induksi kalus kacang tanah. *Media Litbang Sulteng* 4:137-141
- Devi MP, Sahoo MR, Dasgupta M, Prakash N, Ngachan SV (2015) Standardization of *in vitro* regeneration protocol for conservation of Shirui Lily (*Lilium mackliniae*) - An endangered heritage flower under changing climatic conditions. *Procedia Environ Sci* 29:288. doi: 10.1016/j.proenv.2015.07.217
- Ehsanpour AA, Taheri R (2005) Somatic embryogenesis from alfalfa (*Medicago sativa* L.) callus using ethinyle estradiol. *Agris* 9:103-111
- Ibrahim MSD, Hartati RS, Rubiyo, Purwito A, Sudarsono (2013) Direct and indirect somatic embryogenesis on arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indones J Agric Sci* 14:79-86. doi: 10.21082/ijas.v14n2.2013.p79-86
- Indah PN, Ermavitalini E (2013) Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *J Sains Seni Pomits* 2:E1-E6
- Islam N, Islam T, Hossain MM, Bhattacharjee B, Hossain MM, Islam SMS (2017) Embryogenic callus induction and efficient plant regeneration in three varieties of soybean (*Glycine max*). *Plant Tiss Cult Biotechnol* 27:41-50. doi: 10.3329/ptcb.v27i1.35011
- Jan SA, Shah SH, Ali S, Ali GH (2015) The effect of plant growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis of hybrid tomato. *Pak J Bot* 47:1671-1677
- Jeyakumar JJ, Vivekanandan L (2015) Optimization of conditions for callus induction and indirect organogenesis of *Cucumis anguria* L. *Asian J Plant Sci Res* 5:53-61
- Kumar V, Moyo M, Van Staden J (2016) Enhancing plant regeneration *Lachenalia viridiflora*, a critically endangered ornamental geophyte with high floricultural potential. *Sci Hort* 211:263-268. doi: 10.1016/j.scienta.2016.08.024
- Lacefield GD, Henning JC, Rasnake M, Collins M (2011) Alfalfa the queen of forage crops. Cooperative Extension Service. Agr-76. University of Kentucky
- Lizawati (2012) Proliferasi kalus dan embriogenesis somatik jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan berbagai kombinasi ZPT dan asam amino. *Bioplantae* 1:256-265
- Mardaningsih F, Andriani MAM, Kawiji (2012) Pengaruh konsentrasi etanol dan suhu *spray dryer* terhadap karakteristik bubuk klorofil daun alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan menggunakan binder maltodekstrin. *J Teknosains Pangan* 1:110-117
- Mattjik NA (2005) Peran kultur jaringan tanaman dalam perbaikan tanaman. Orasi ilmiah guru besar tetap kultur jaringan. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
- Mohamadi-Nasab A, Motallebi-Azar A, Movafeghi A, Dadpour M (2011) Callus induction and embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl thin cell layer culture. *Russ Agricult Sci* 37:303-306. doi: 10.3103/S1068367411040148
- Mohajer S, Taha RM, Khorasani A, Yaacob JS (2012) Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Aus J Crop Sci* 6:1305-1313
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nakasha JJ, Sinniah UR, Kemat N, Mallappa KS (2016) Induction, subculture cycle, and regeneration of callus in safed musli (*Chlorophytum borivillanum*) using different types of phytohormones. *Pharmacogn Mag* 12:S460-S464. doi: 10.4103/0973-1296.191457
- Pawar B, Kale P, Bahurupe J, Jadhav A, Kale A, Pawar S (2015) Proline and glutamine improve *in vitro* callus induction and subsequent shooting in rice. *Rice Sci* 22:283-289. doi: 10.1016/j.rsci.2015.11.001
- Rose RJ, Song Y (2017) Somatic embryogenesis. Pp 474-479. In: Thomas B, Murray BG, Murphy DJ (Eds). *Encyclopedia of Applied Plant*

- Sciences. 2nd Edition. Volume 2. Elsevier, Amsterdam. doi: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00147-7
- Sah SK, Kaur A, Sandhu JS (2014) High frequency embryogenic callus induction and whole plant regeneration in japonica rice Cv. Kitaake. *J Rice Res* 2:125. doi: 10.4172/jrr.1000125
- Sah SK, Kaur A (2013) Genotype independent tissue culture base line for high regeneration of japonica and indica rice. *Res J Biotechnol* 8:96-101
- Sankepally SSR, Singh B (2016) Optimization of regeneration using differential growth regulators in indica rice cultivars. *3 Biotech*. 6:19. doi: 10.1007/s13205-015-0343-0
- Shahsavari E, Maheeran AA, Akmar ASN, Hanafi MM (2010) The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. *Afr J Biotechnol* 9:2089-2094
- Sirait J, Syawal M, Simanihuruk K (2010) Tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) adaptif dataran tinggi iklim basah sebagai sumber pakan: Morfologi, produksi dan palatabilitas. Pp 519-528. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner
- Tyas KN, Susanto S, Dewi IS, Khumaida N (2016) Organogenesis tunas secara langsung pada pamelon (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). *Buletin Kebun Raya* 19:1-10. doi: 10.14203/bkr.v19i1.176
- Utsumi Y, Utsumi C, Tanaka M, Ha VT, Matsui A, Takahashi S, Seki M (2017) Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and phosphate. *PLoS One* 12:e0180736. doi: 10.1371/journal.pone.0180736
- Van Harten AM (1998) Mutation breeding: Theory and practical applications. Cambridge University Press, London
- Verma SK, Das AK, Cingoz GS, Uslu E, Gurel E (2016) Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotechnol Rep* 10:66-77. doi: 10.1016/j.btre.2016.03.006
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W (1997) Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 49:213-218. doi: 10.1023/A:1005704429339
- Zhao W, Zheng S, Ling HQ (2011) An efficient regeneration system and *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese upland rice cultivar Handao297. *Plant Cell Tiss Org*. 106:475-483. doi: 10.1007/s11240-011-9946-2