

## Daya Tumbuh Kalus Lamtoro Varietas Tarramba Hasil Iradiasi Sinar Gamma 40 Gray yang Toleran Asam pada Media 2.4-D

Latief MF<sup>1)\*</sup>, PDMH Karti<sup>2)</sup>, I Prihantoro<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Mahasiswa Program Pasca Sarjana Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

<sup>2)</sup>Dosen Program Pasca Sarjana Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor  
Email: daengfadhli@gmail.com

### Abstrak

Pemuliaan tanaman lamtoro dalam bentuk kalus embriogenik dengan iradisasi sinar *gamma* diperlukan untuk pengembangan galur baru tanaman yang toleran masam dengan pendekatan mutasi gen secara kultur jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur daya tumbuh kalus mutan putatif lamtoro (*Leucaena leucocephala* cv. Tarramba) hasil penyinaran 40 gray yang teradaptasi masam pada media zat pengatur tumbuh (ZPT) 2.4-D (*dichlorophenoxyacetic acid*). Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Sumber kalus yang digunakan merupakan hasil seleksi dari level asam berbeda. Kalus tersebut terdiri dari kalus yang tidak teradaptasi asam (K0), kalus yang tahan asam dengan level 100 ppm (K1), 200 ppm (K2), dan 300 ppm (K3) pada media 2.4-D 2 mg l<sup>-1</sup>. Peubah yang diukur adalah viabilitas kalus, laju pertumbuhan diameter dan tinggi kalus, dan pertambahan diameter dan tinggi kalus pada media ZPT 2.4-D. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai viabilitas tertinggi terdapat pada kalus mutan K2 sebesar 81,25%. Laju pertumbuhan diameter tertinggi terdapat pada kalus mutan K1 dengan nilai korelasi sebesar 98%. Pertambahan diameter di 4-6 minggu setelah tanam (MST) menunjukkan bahwa kalus K2 berbeda nyata lebih tinggi ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan kalus lainnya. Disimpulkan bahwa sumber kalus mutan putatif yang lolos seleksi level asam berbeda tidak berpengaruh terhadap daya tumbuh kalus lamtoro pada media ZPT 2.4-D.

Kata kunci: asam, kalus, kultur jaringan, lamtoro, mutan putatif

### Abstract

*Lamtoro plant breeding in the form of embryogenic callus through gamma ray irradiation is required to develop new plant-that acid soil tolerant with a gene mutation approach in tissue culture. The aim of this study was to measure Lamtoro (*Leucaena leucocephala* cv. Tarramba) callus growth resulted by gamma irradiation 40 gray that acid adapted on 2.4-D (*dichlorophenoxyacetic acid*) media. The experimental design in this study was a complete randomized design (CRD). Callus source was the result of different acid levels selection. The callus comprises acid-free callus (K0), and acid-resistant callus that grown on 100 ppm (K1), 200 ppm (K2), and 300 ppm (K3) of 2.4-D 2 mg l<sup>-1</sup> medium. The variables were callus viability, growth rate of diameter and callus height, and the increase of callus diameter and height on ZPT 2.4-D media. The results showed that the highest*

viability value was found in the mutant K2 callus of 81.25%. The highest growth rate of diameter was found in K1 mutant callus with correlation value of 98%. The increase in diameter at 4-6 weeks after planting (WAP) showed that K2 callus was higher ( $P > 0.05$ ) than the other callus. It was concluded that different putative mutant callus source did not affect lamtoro callus growth on ZPT 2,4-D media.

*Keywords: acid, callus, tissue culture, lamtoro, putative mutant*

## PENDAHULUAN

Lamtoro yang biasa digunakan untuk hijauan pakan dapat disebut sebagai *the miracle tree* atau pohon ajaib. Lamtoro memiliki bintil akar yang terinfeksi bakteri penambat nitrogen dapat berperan sebagai penyubur tanah (Rogel, 2011). Manfaat lain lamtoro dapat menjadi bioremediasi pada lahan pertanian dengan kontaminasi tembaga yang tidak melampaui batas (Gardezi *et al.* 2016) serta dapat digunakan untuk silvopastura atau integrasi ruminansia dengan hutan (Diaz *et al.*, 2008).

Lamtoro ini multiguna karena seluruh bagian tanaman dapat dimanfaatkan baik untuk kepentingan manusia maupun hewan. Lamtoro pada ransum ruminansia mencapai 24-30% pada setiap varietasnya (Barros-Rodríguez 2014). Pada umumnya penggunaan lamtoro sebagai suplemen pada pertanian peternakan di negara-negara tropis secara luas telah diterapkan. Lamtoro merupakan salah satu jenis leguminosa pohon dengan kualitas protein yang tinggi, yaitu sekitar 15% sampai 38% (Zayed *et al.* 2014) bergantung pada umur tanaman dan selain itu lamtoro juga sebagai hijauan pakan sumber mineral kalsium dan fosfor.

Tanaman lamtoro tumbuh baik di Indonesia khususnya di Indonesia bagian Timur. Salah satu yang banyak terdapat di daerah tersebut yaitu lamtoro varietas tarramba. Menurut Nulik *et al.* (2004) Lamtoro varietas tarramba yang toleran terhadap serangan hama salah satunya kutu loncat dan toleran pada kekeringan atau musim kemarau tetapi belum terdapat laporan toleran terhadap kondisi masam. Indonesia memiliki potensi lahan dengan sifat tanah kering masam yang luas. Kemasaman tanah yang dicirikan pH rendah dapat disebabkan karena kandungan aluminium tanah yang cukup tinggi (Prasetyo *et al.*, 2006).

Cekaman aluminium bisa menjadi racun bagi tanaman yang tumbuh, oleh karena itu tanaman lamtoro yang toleran terhadap kondisi pH rendah dapat memanfaatkan potensi lahan-lahan marjinal di Indonesia khususnya dengan kondisi kering masam. Permasalahan ini bisa terpecahkan dengan penerapan bioteknologi tumbuhan pakan melalui kultur jaringan yang dapat menyeleksi tanaman lamtoro unggul yang toleran terhadap asam.

Kultur jaringan adalah teknik untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga dapat bagian tanaman yang dikultur dapat diperbanyak secara massal dan cepat (Wattimena *et al.* 2011). Dengan berkembangnya teknologi kultur in vitro, maka keragaman genetik dapat ditingkatkan antara lain melalui keragaman somaklonal.

Keragaman tersebut dapat ditingkatkan dengan berbagai perlakuan antara lain pemberian mutagen fisik (sinar *gamma*) atau pemberian stres pada kumpulan sel somatik yang bersifat embriogenik. Mutasi dapat menyebabkan perubahan genetik

akibat perubahan urutan basa nukleotida DNA yang menyebabkan adanya perubahan susunan asam amino sehingga berubah pula protein yang terbentuk. Agisimanto *et al.* (2016) menyatakan induksi mutasi dapat meningkatkan frekuensi variasi somatik dari tanaman yang diharapkan dapat dibentuk beberapa variasi tanaman dengan beragam sifat unggul. Induksi mutasi yang paling tepat untuk merekayasa genetik yaitu melakukan penyinaran pada sel kalus.

Kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Kalus yang telah diiradiasi sinar *gamma* kemudian diseleksi dengan stres asam melalui media aluminium. Telah dilaporkan oleh Manpaki (2017) bahwa tingkat toleransi *L. leucocephala* cv. tarramba optimal pada level 100 ppm aluminium (pH 5.5) berdasarkan karakteristik morfologi tanaman. Sumber kalus yang telah teradaptasi asam belum diketahui daya tumbuhnya pada media pertumbuhan setelah tercekam aluminium. Kalus dimultipikasi atau disubkultur pada media yang terkandung dalam zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti hormon auksin. Menurut Lestari (2011) untuk pembentukan kalus menggunakan auksin yaitu 2,4-D (*dichlorophenoxyacetic acid*). Kandidat kalus mutan putatif lamtoro mutunggul yang toleran asam diperbanyak pada media auksin selanjutnya berpotensi untuk diregenerasikan pada media regenerasi. Adapun penelitian ini bertujuan untuk mengukur daya tumbuh kalus lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) hasil penyinaran iradisasi sinar *gamma* 40 gray yang teradaptasi asam pada media ZPT 2,4-D.

## METODE PENELITIAN

Stok kalus embriogenik lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) hasil penyinaran 40 gray yang telah diseleksi pada media asam  $\text{AlCl}_3$  diperbanyak pada media ZPT 2,4-D  $2 \text{ mg l}^{-1}$  dan media basal yaitu 1 liter aquades media MS 4.43 gram  $\text{l}^{-1}$ , agar 7 gram  $\text{l}^{-1}$ , dan gula 30 gram  $\text{l}^{-1}$  selama 10 minggu dengan lingkungan suhu  $25^\circ\text{C}$  di bawah pencahayaan lampu *florence* 800-1000 lux 16 jam/hari.

Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan berdasarkan sumber kalus mutan putatif 40 gray dari media tanpa asam (K0), kalus yang tahan asam dengan level 100 ppm (K1), 200 ppm (K2), dan 300 ppm (K3) pada media 2,4-D  $2 \text{ mg l}^{-1}$ .

Peubah yang diukur meliputi viabilitas (%) diameter dan tinggi kalus (mm), pertambahan diameter dan tinggi kalus ( $\text{mm minggu}^{-1}$ ). Diameter dan tinggi kalus diukur dengan cara mengukur bagian kanopi kalus (titik tumbuh maksimum kalus) sampai bagian tanaman yang masih muncul di atas media dengan menggunakan jangka sorong *KANON 150 mm*. Pertambahan diameter dan tinggi kalus diukur dari hasil minggu x dikurangi minggu x-1. Viabilitas tanaman dilakukan dengan cara menghitung persentase kalus yang hidup (sel-sel masih berdiferensiasi membentuk kalus dan tunas baru) setiap perlakuan yang tumbuh pada minggu ke-1.

Data berupa viabilitas dianalisis menggunakan analisis deskriptif. Adapun respon pada sumber kalus mutan putatif dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (Anova), selanjutnya apabila terdapat perbedaan yang nyata akan dilakukan uji lanjut Duncan pada tingkat ketelitian 5% (Matjik dan Sumertajaya, 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Viabilitas Kalus Mutan Putatif Lamtoro (*L. leucocephala* var. *tarramba*) yang Terseleksi Asam Berbeda pada Media ZPT 2.4-D

Viabilitas kalus menggambarkan daya tumbuh kalus yang telah tercekam media asam pada media auksin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bervariasi pada nilai viabilitas kalus mutan putatif dengan sumber kalus berbeda pada media ZPT 2.4-D (Tabel 1).

Tabel 1 Viabilitas (%) kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* var. *tarramba*) yang terseleksi asam berbeda pada 10 minggu setelah tanam

Peubah	Sumber Kalus Mutan Putatif			
	K0	K1	K2	K3
Jumlah Kalus Awal	19	13	16	85
Jumlah Kalus yang Bertahan (N)	14	9	13	64
Viabilitas (%)	73,68	69,23	81,25	75,29

Keterangan: Sumber kalus mutan putatif K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm.

Jumlah kalus awal menggunakan jumlah stok awal yang kandidat kalus unggul tersedia, pada kalus K3 menggunakan jumlah lebih banyak daripada yang lain disebabkan kalus yang level asam tertinggi cenderung mengurangi jumlah kalus yang bertahan. Hasil penelitian nilai viabilitas tertinggi yaitu kalus K2 (81,25%) dan terendah pada kalus K1 (69,23%). Tingginya kemampuan viabilitas K2 menunjukkan bahwa kemampuan sel dari kalus tersebut untuk berkembang dan rendahnya potensi kerusakan sel.

Kerusakan sel terjadi karena ada kalus yang terkontaminasi jamur dan mengalami nekrosis dengan ciri khas berwarna kecokelatan kemudian ada yang sampai berwarna kehitaman. Menurut Santosa dan Nursandi (2003) *browning* (pencokelatan) dapat disebabkan oleh penggunaan bahan tanam yang tidak meristematik atau jaringan dewasa, tindakan sterilisasi yang berlebihan, media yang tidak cocok atau lingkungan yang tidak mendukung. Kondisi lingkungan yang baru dari yang sebelumnya tercekam menjadikan kalus untuk beradaptasi pada lingkungan yang baru.

Kalus yang bertahan bercirikan berwarna hijau memandakan sel kalus tetap bertahan pada media yang ZPT 2.4 D. Perubahan morfologi kalus menurut Bermawie *et al.* (2015) respon kalus bergantung ukuran dan volume dari inti sel serta kromosom yang didukung oleh faktor suhu dan lingkungan. Faktor lingkungan media berbeda dari media sebelumnya itu media cekaman asam maka kalus mutan K2 memiliki daya viabilitas lebih tinggi dari pada kalus mutan K0 yang tidak terseleksi cekaman asam, walaupun pada K1 viabilitasnya masih lebih rendah daripada K0.

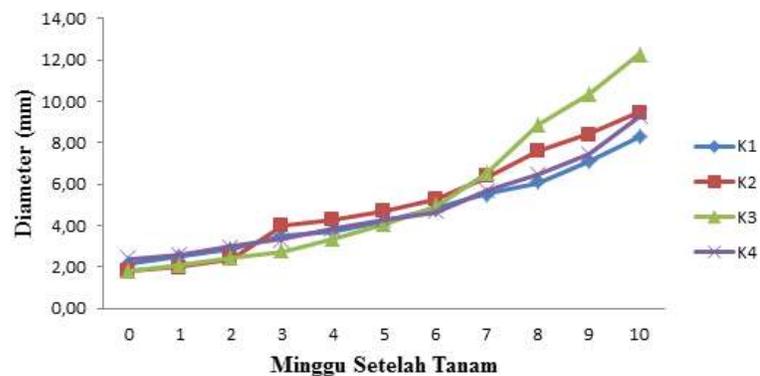
Kecenderungan menurunnya daya hidup karena terjadi kerusakan sel atau nekrosis sehingga menyebabkan berkurangnya kemampuan kalus untuk bermultiplikasi dan beregenerasi. Adapun menurut Taheri *et al.* (2014) bahwa kerusakan sel disebabkan oleh radikal bebas yang saling bergabung dan membentuk toksik seperti hidrogen peroksida terutama pada sel vegetatif yang mengandung air 80% pada sitoplasmanya. Visualisasi kalus yang mengalami pencokelatan (*browning*) atau nekrosis disajikan pada Gambar 1.



Gambar 5 Kalus yang mengalami pencokelatan atau nekrosis.

#### Diameter Kalus Mutan Putatif Lamtoro (*L. leucocephala* var. Tarramba) yang Terseleksi Asam Berbeda pada Media ZPT 2.4-D Berdasarkan Umur Kalus

Ukuran diameter kalus mutan putatif menunjukkan peningkatan ukuran seiring lamanya penanaman kalus. Ukuran diameter kalus mutan putatif lamtoro berdasarkan umur pemeliharaan disajikan pada Gambar 2. Secara umum ukuran diameter kalus meningkat menandakan bahwa kalus tumbuh dengan baik.



Gambar 2 Laju pertumbuhan diameter kalus mutan putatif lamtoro yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D.

Gambar 2 menunjukkan bahwa tinggi kalus mutan putatif lamtoro meningkat seiring dengan meningkatnya umur kalus mutan putatif lamtoro. Tinggi kalus mutan putatif diduga disebabkan karena pembelahan sel secara terus menerus akibat

adanya penyerapan auksin, hal ini diperkuat oleh Sari *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa penyerapan auksin eksogen dan endogen akan menyebabkan pembelahan sel secara terus menerus sehingga meningkatkan jumlah jaringan selnya.

Tabel 2 Persamaan grafik laju diameter kalus mutan putatif lamtoro yang terseleksi asam berbeda selama 70 hari

Sumber Kalus	Persamaan	R <sup>2</sup>	Signifikansi
K0	Y=0,58x+1,38	0,96	AB
K1	Y=0,78x+0,44	0,98	A
K2	Y=1,03x+0,82	0,90	B
K3	Y=0,64x+0,99	0,92	AB

Keterangan: Sumber kalus mutan putatif K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm. Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan uji berbeda nyata pada taraf 5%.

Kalus mutan putatif lamtoro pada level cekaman masam yang berbeda mengalami pertumbuhan tinggi yang berbeda. Perbedaan pertumbuhan tinggi tanaman ini dapat dilihat berdasarkan persamaan grafik pertumbuhan tinggi tanaman. Persamaan regresi laju tinggi kalus mutan putatif lamtoro disajikan pada Tabel 2.

Persamaan regresi laju diameter kalus mutan putatif yang terseleksi asam selama 10 minggu dengannilai R<sup>2</sup> yang menunjukkan nilai kolerasi antara hari pengamatan (umur kalus) dan tinggi tanaman. Nilai R<sup>2</sup> pada keempat perlakuan hampir sama yaitu berkisar antara 0,90-0,98. Hasil ini menunjukkan hari pengamatan (umur kalus) mempengaruhi tinggi tanaman sebesar 90%-98%. K1 memiliki korelasi tertinggi atau hubungan yang erat antara pertumbuhan diameter kalus dan minggu setelah tanam dengan nilai 98%.

Gradien grafik (angka sebelum variabel x) kalus mutan putatif lamtoro memiliki nilai rata-rata y yang berbeda. Hasil analisis ragam terhadap gradien grafik keempat sumber kalus menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) yang tertinggi berturut-turut yaitu 40 gray 200 ppm, 40 gray 300 ppm, 40 gray 0 ppm, dan 40 gray 100 ppm. Hal ini menggambarkan bahwa kalus 40 gray 200 ppm, memiliki laju pertumbuhan tertinggi daripada kalus mutan putatif yang lain ditandai dengan pembengkakan kalus paling tinggi.

Pembengkakan yang terjadi karena adanya pengaruh pemberian 2.4-D pada eksplan merupakan suatu proses pertumbuhan setelah terjadinya proses pelengkungan akibat penyerapan air dan nutrisi dari media yang selanjutnya disertai dengan tahap perbanyakan sel (Purba *et al.*, 2017). Diameter kalus merupakan peubah yang paling menonjol untuk mengukur karakteristik pertumbuhan dari kalus pada media auksin.

#### **Pertambahan diameter kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) yang terseleksi asam berbeda pada Media ZPT 2.4-D**

Pertambahan diameter kalus mutan putatif menggambarkan terjadi pertumbuhan dengan baik oleh kalus pada media ZPT 2.4-D. Pertambahan diameter kalus mutan putatif ditandai dengan pembengkakan eksplan kalus. Pembengkakan

terjadi setelah kalus disubkultur dari cekaman media asam lalu ke media auksin untuk perkembangbiakan kalus.

Kalus yang bertahan tumbuh dengan baik ditandai dengan pertambahan diameter, setiap milimeter kalus yang bertambah maka akan semakin bertambah jumlah sel-sel sebagai materi genetik untuk terus berkembang dan berpotensi untuk beregenerasi menjadi tunas. Adapun nilai pertambahan diameter kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Pertambahan diameter kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* cv. tarramba) yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D.

MST	Sumber Kalus Mutan Putatif							
	K0	n	K1	n	K2	n	K3	n
-----mm minggu-1-----								
1 MST	0,37±0,23	19	0,40±0,58	13	0,30±0,23	16	0,23±0,24	85
2 MST	0,30±0,22	19	0,38±0,25	12	0,36±0,30	16	0,38±0,34	85
3 MST	0,61±0,25b	18	1,58±0,40a	12	0,31±0,28c	16	0,36±0,30c	85
4 MST	0,26±0,27b	18	0,29±0,25b	12	0,65±0,42a	16	0,50±0,43ab	85
5 MST	0,44±0,36ab	18	0,44±0,52ab	12	0,71±0,50a	16	0,39±0,41b	70
6 MST	0,55±0,42±b	16	0,50±0,38b	11	0,83±0,61a	16	0,41±0,36b	70
7 MST	0,79±0,63	16	1,10±1,15	11	1,58±1,28	16	1,03±0,98	70
8 MST	0,41±0,32	14	0,81±1,23	9	1,77±1,00	13	0,79±0,71	64
9 MST	1,00±0,87	14	0,81±0,67	9	1,54±1,32	13	1,00±0,79	64
10 MST	1,24±0,98	14	1,06±1,17	9	1,92±1,32	13	1,84±1,27	64
Rataan	0,57±0,57		0,72±0,70		0,95±0,99		0,65±0,78	

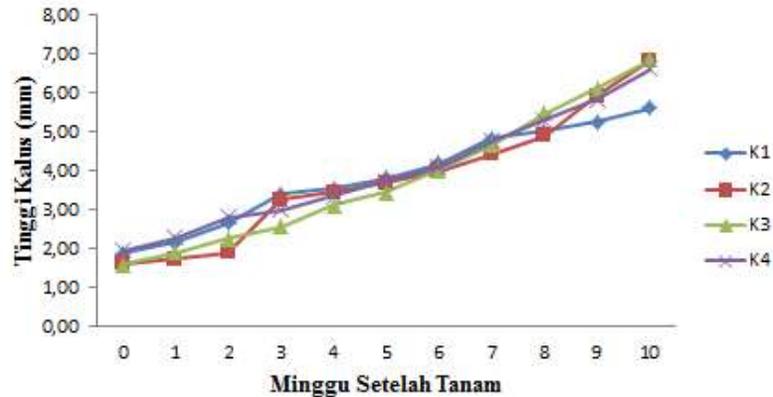
Keterangan: Sumber kalus mutan putatif K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm. MST= Minggu Setelah Tanam. Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan uji berbeda nyata pada taraf 5%. n= jumlah ulangan.

Diameter kalus pada 4 dan 6 MST menunjukkan bahwa pertambahan diameter sumber kalus dengan pola bervariasi. Pada 3 MST pertambahan diameter K1 lebih tinggi daripada K2 dan K3 dan terdapat perbedaan yang nyata. Pada 5 MST sumber kalus K3 lebih rendah daripada K2 dan K3. Pada rata-rata pertambahan diameter kalus dari 1 MST hingga 10 MST terdapat sumber kalus K2, K1, K3 dan K0 yaitu 0,95±0,99 mm, 0,72±0,70 mm, 0,65±0,78 mm, dan 0,57±0,57 mm. Respon awal inisiasi dari perlukaan jaringan yang mulai berubah bentuk menjadi massa kalus sejalan dengan bertambahnya umur kultur (Syahid, *et al.* 2010). Salah satu faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan eksplan kalus dalam kultur *in vitro* adalah genotipe asal eksplan yang diisolasi (Basri, 2016).

### **Tinggi Kalus Mutan Putatif Lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) yang Terseleksi Asam Berbeda pada Media ZPT 2.4-D Berdasarkan Umur Kalus**

Tinggi kalus mutan putatif lamtoro yang lolos seleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D menunjukkan fase perkembangan kalus melalui tiga tahap yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi sel (Zulkarnain dan Lizawati, 2011).

Pembentukan kalus ditentukan sumber eksplan. Komposisi nutrisi pada medium dan faktor lingkungan. Laju tinggi kalus dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Laju pertumbuhan tinggi kalus mutan putatif lamtoro yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D.

Gambar 3 terlihat bahwa terjadi peningkatan tinggi kalus dari 0 MST sampai 10 MST. Pembelahan sel pada kalus dipengaruhi oleh hormon auksin sehingga berdampak pada pertumbuhan morfologi kalus terutama pada tinggi kalus. Ukuran tinggi kalus mutan putatif menunjukkan peningkatan ukuran seiring lamanya penanaman. Laju pertumbuhan tinggi tiap sumber kalus dari K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm pada Gambar 3 cenderung sama peningkatannya. Secara umum ukuran diameter kalus meningkat menandakan bahwa kalus tumbuh dengan baik ditandai dengan pembengkakan kalus.

Pembengkakan eksplan ditandai dengan perubahan pada bekas pelukaan yang menebal dikarenakan terjadinya penambahan ukuran dan jumlah sel-sel eksplan di daerah tersebut (Hendrayono dan Wijayani, 1994). Adapun untuk persamaan regresi pada laju pertumbuhan tinggi kalus disajikan pada Tabel 4, dari tabel tersebut dapat dilihat signifikansi dan nilai korekasi antara laju pertumbuhan tinggi dan masa minggu setelah tanam kalus mutan putatif yang teradaptasi berbeda selama 70 hari di media ZPT 2.4-D.

Tabel 4 Persamaan grafik laju tinggi kalus mutan putatif lamtoro yang terseleksi asam berbeda selama 70 hari.

Sumber Kalus	Persamaan	R <sup>2</sup>
K0	$Y=0,38x+1,59$	0,96
K1	$Y=0,50x+0,82$	0,96
K2	$Y=0,53x+0,66$	0,98
K3	$Y=0,45x+1,30$	0,98

Keterangan: Sumber kalus mutan putatif K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm. Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan uji berbeda nyata pada taraf 5%.

Tabel 4 terdapat persamaan regresi dengan  $R^2$  (koefisien determinasi) 0,96 dan 0,98 menunjukkan bahwa hubungan tinggi kalus dan minggu setelah tanam untuk K0 dan K1 96% dan K2 dan K3 98% tetapi pada saat analisis ragam tidak berpengaruh nyata ( $P>0,05$ ) untuk tinggi kalus satu sama lain. Auksin jenis 2,4-D dapat meningkatkan pemanjangan sel, pembengkakan sel dan pembentukan akar adventif (Purba *et al.*, 2017). Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Bekti *et al.*, 2003).

#### Pertambahan tinggi kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* cv. tarramba) yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D.

Pertambahan tinggi kalus mutan putatif menggambarkan terjadi pertumbuhan dengan baik oleh kalus pada media ZPT 2.4-D. Pertambahan tinggi kalus menunjukkan pertumbuhan vertikal pada kalus perminggu dengan pertambahan permilimeter. Satu milimeter kalus berisi ribuan sel dan masing-masing memiliki kemampuan untuk membentuk embrio sehingga kecepatan multiplikasi sangat tinggi. Nilai pertambahan diameter disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 Pertambahan tinggi kalus mutan putatif lamtoro (*L. leucocephala* cv. Tarramba) yang terseleksi asam berbeda pada media ZPT 2.4-D.

MST	Sumber Kalus Mutan Putatif							
	K0	n	K1	n	K2	n	K3	n
	-----mm minggu-1-----							
1 MST	0,29±0,22	19	0,28±0,53	13	0,31±0,29	16	0,34±0,26	85
2 MST	0,49±0,31a	19	0,16±0,09b	12	0,36±0,41ab	16	0,51±0,34a	85
3 MST	0,71±0,41b	18	1,36±0,56a	12	0,33±0,22c	16	0,20±0,17c	85
4 MST	0,14±0,10c	18	0,18±0,19ab	12	0,53±0,39a	16	0,34±0,31b	85
5 MST	0,26±0,17	18	0,24±0,18	12	0,33±0,23	16	0,36±0,48	70
6 MST	0,34±0,30ab	16	0,24±0,14b	11	0,59±0,54a	16	0,37±0,40ab	70
7 MST	0,64±0,36	16	0,41±0,48	11	0,64±0,53	16	0,66±0,61	70
8 MST	0,14±0,12	14	0,3±0,26	9	0,50±0,48	13	0,57±0,58	64
9 MST	0,23±0,25c	14	1,01±0,54a	9	0,63±0,49ab	13	0,52±0,49bc	64
10 MST	0,35±0,42	14	0,91±0,76	9	0,74±0,59	13	0,78±0,79	64
Rataan	0,37±0,39		0,49±0,57		0,49±0,49		0,45±0,49	

Keterangan: Sumber kalus mutan putatif K0= 40 gray 0 ppm, K1=40 gray 100 ppm, K2=40 gray 200 ppm, K3=40 gray 300 ppm. MST= Minggu Setelah Tanam. Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan uji berbeda nyata pada taraf 5%. n= jumlah ulangan.

Bervariasinya pertambahan tinggi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respon pada sumber kalus yang berbeda pada media ZPT 2.4-D. Proses terbentuknya kalus sampai terjadi diferensiasi berbeda-beda tergantung macam genetik kalus yang dipakai untuk eksplan, bahan kimia atau hormon yang terkandung pada media kultur. Potensi terbesar penggunaan kultur kalus adalah dimana sel-sel kalus dapat dipisahkan dan diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi *embrio somatic*. Proses ini menerangkan bahwa sel tumbuhan memiliki

kemampuan untuk menyerap air dan unsur hara sehingga menyebabkan terjadinya pertambahan ukuran dan jumlah sel yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya pembengkakan jaringan (Purba *et al.*, 2017).

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kalus mutan dengan viabilitas tertinggi ke terendah berturut-turut pada K2, K3, K0, dan K1 yaitu 81,25%, 75,29%, 73,68%, dan 69,23%. Laju pertumbuhan diameter tertinggi terdapat pada kalus mutan K1 dengan nilai korelasi sebesar 98%. Pertambahan diameter di 4-6 minggu setelah tanam (MST) menunjukkan bahwa kalus K2 berbeda nyata lebih tinggi ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan kalus lainnya. Disimpulkan bahwa sumber kalus mutan putatif yang lolos seleksi level asam berbeda tidak berpengaruh terhadap daya tumbuh kalus lamtoro pada media ZPT 2.4-D.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto D, Noor NM, Ibrahim R & Mohamad A. 2016. Gamma irradiation effect on embryogenic callus growth of *Citrus reticulata* cv. limau madu. *Sains Malaysiana*. 45 (3): 329-337.
- Barros-Rodríguez MR, Castro CAR, Sánchez JS, Franco LAS, Herrera RR, & Klieve AV. 2014. *Leucaena leucocephala* in ruminant nutrition. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17 (2014): 173 – 183.
- Basri, AHH. 2016. Kajian pemanfaatan kultur jaringan dalam perbanyakan tanaman bebas virus. *Agrica Ekstensi*. Vol 10 No. 1 Juni 2016: 64-73.
- Bermawie, N, Nur L, Purwanti P, & Melati. 2015. The effect of gamma irradiation on the growth and production of small white ginger (*Zingiber officinale* var. Amarum). *Jurnal ittri* . (21) 2 : 47-56.
- Díaz A, Martín PC, Castillo E & Hernández JL. 2008. Fattening of zebu bulls with rumen activator supplement in silvopastoral system of leucaena and natural pasture. *Cuban J. Agriculture Science*, 42. p.155.
- Gardezi AK, Barceló ID, Exebio-García A, Mejía-Saenz E, Larqué-Saavedra U, Márquez-Berber & Talavera-Magaña D. 2016. Cu<sup>2+</sup> bioaccumulation by *Leucaena leucocephala* in symbiosis with *Glomus Spp.* and *Rhizobium* in copper-containing Soil. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*. 2 (5): 181-190.
- Hendrayono DP dan Wijayani. 1994. *Teknik kultur jaringan*. Yogyakarta (ID): Kanisius.
- Lestari EG. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal Agro Biogen*. 7 (1): 63-68
- Manpaki, SJ, Karti, PDM, Prihatoro I. (2017). Respon pertumbuhan eksplan tanaman lamtoro (*Leucaena leucocephala* cv. Tarramba) terhadap cekaman kemasaman media dengan level pemberian aluminium melalui kultur jaringan. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 12 (1).
- Matjik AA & Sumertajaya M. 2006. *Perancangan percobaan dengan aplikasi SAS dan Minitab*. Edisi ke-2. Bogor (ID): IPB Press.

- Nulik J, Kana D, Fernadez P & Ratnawati S. 2004. Adaptasi beberapa leucaena species di Pulau Timor dan Sumba, Nusa Tenggara Timur. In *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner* (4-5).
- Prasetyo BH & Suriadikarta DA. 2006. Karakteristik, potensi, dan teknologi pengelolaan tanah ultisol untuk pengembangan pertanian lahan kering di Indonesia. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 25 (2): 39-46.
- Purba RV, Yuswanti H & Astawa. 2017. Induksi kalus eksplan daun tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan aplikasi 2, 4-D secara in vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 6 (2).
- Rahayu B & Anggarwulan E. 2003. Pengaruh asam 2, 4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1 (1): 1-6.
- Rogel MA, Ormeno-Orrillo E & Romero EM. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*. 34 (2): 6-104.
- Santosa U & Nursandi. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang (ID): Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Sari L, Purwito A, Sopandie D, Purnamaningsih R & Sudarmonowati E. 2013. Pengaruh irradiasi sinar gamma pada pertumbuhan kalus dan tunas tanaman gandum (*Triticum aestivum*). <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/64604>
- Syahid SF, Kristina NN & Seswita D. 2010. Pengaruh komposisi media terhadap pertumbuhan kalus dan kadar tannin dari daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) secara in vitro. *Industrial Crops Research Journal*. 16 (1): 1-5.
- Taheri S, Abdullah TL, Karimi E, Oskoueian E & Ebrahimi M. 2014. Antioxidant capacities and total phenolic contents enhancement with acute gamma irradiation in *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) leaves. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (7): 13077-13090.
- Wattimena GA, Wiendi NM, Ansori N, Purwito A, Efendi D, Khumaida N & Purwoko BS. 2011. *Bioteknologi dalam Pemuliaan Tanaman*. Bogor (ID): IPB Press.
- Zayed MZ, Ahmad FB, Zaki MA, Ho WS, & Pang SL. 2014. The reduction of mimosine content in *Leucaena leucocephala* (petai belalang) leaves using ethyl methanesulphonate (EMS). *Arch Appl Sci Res*. 6 (4): 124-128.
- Zulkarnain & Lizawati. 2011. Proliferasi kalus dari eksplan hipokotil dan kotiledon tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) pada pemberian 2,4-D. *Jurnal Natur Indonesia*. 14 (1): 19-25.