II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kedelai

Kedelai merupakan adalah salah satu tanaman polong-polongan yang menjadi bahan dasar banyak makanan dari Asia Timur dan telah dibudidayakan sejak 3500 tahun yang lalu. Kedelai mulai dikenal di Indonesia sejak abad ke-16. Awal mula penyebaran dan pembudidayaan kedelai yaitu di Pulau Jawa, kemudian berkembang ke Bali, Nusa Tenggara, dan pulau-pulau lainnya. Kedelai yang dibudidayakan adalah *Glycine max* yang merupakan keturunan domestikasi dari spesies moyang *Glycine soja.* Kedelai adalah tumbuhan yang peka terhadap pencahayaan. Pada pencahayaan agak rendah, batangnya akan mengalami pertumbuhan memanjang sehingga berwujud seperti tanaman merambat.

Tanaman kedelai (*Glycine max* [L.] Merr.) diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio : Spermatophyta

Classis : Dicotyledoneae

Ordo : Polypetales

Familia : Fabaceae (Leguminosae)

Genus : Glycine

Species : *Glycine max* (L.) Merill

Daun kedelai merupakan daun majemuk yang terdiri dari tiga helai anak daun (trifoliat) dan umumnya berwarna hijau muda atau hijau kekuning–kuningan. Bentuk daun ada yang oval, juga ada yang segitiga. Warna dan bentuk daun kedelai ini tergantung pada varietas masing – masing. Namun, umumnya pada buku (*nodus*) pertama tanaman yang tumbuh dari biji terbentuk sepasang daun tunggal. Selanjutnya, pada semua buku di atasnya terbentuk daun majemuk selalu dengan tiga helai. Permukaan daun berbulu halus pada kedua sisi. Tunas atau bunga akan muncul pada ketiak tangkai daun majemuk. Setelah tua, daun menguning dan gugur, mulai dari daun yang menempel di bagian bawah batang (Anonim, 2013).

Biji kedelai berbentuk polong, setiap polong berisi 1–4 biji. Biji umumnya berbentuk bulat atau bulat pipih sampai bulat lonjong. Ukuran biji berkisar antara 6 – 30g/100 biji, ukuran biji diklasifikasikan menjadi 3 kelas yaitu biji kecil (6–10 g/100 biji), biji sedang (11–12 g/100 biji) dan biji besar (13 g atau lebih/100 biji). Warna biji bervariasi antara kuning, hijau, coklat dan hitam (Fachruddin, 2000).

Kecepatan pembentukan polong dan pembesaran biji akan semakin cepat setelah proses pembentukan bunga berhenti. Ukuran dan bentuk polong menjadi maksimal pada saat awal periode pemasakan biji. Hal ini kemungkinan diikuti oleh perubahan warna polong, dari hijau menjadi kuning kecoklatan pada saat masak. Biji – biji kedelai berkeping dua terbungkus kulit biji (*lesta*) dan tidak mengandung jaringan endosperm. Embrio terbentuk di antara keping biji. Bentuk biji pada umumnya bulat lonjong, tetapi ada yang bundar dan bulat agak pipih.

Warna kulit biji bermacam-macam, ada yang kuning, hitam, hijau atau coklat (Adisarwanto, 2005).

Kedelai dapat tumbuh pada kondisi suhu yang beragam. Suhu tanah yang optimal dalam proses perkecambahan yaitu 30° C, bila tumbuh pada suhu yang rendah (< 15° C), proses perkecambahan menjadi sangat lambat bisa mencapai 2 minggu. Hal ini dikarenakan perkecambahan biji tertekan pada kondisi kelembapan tanah tinggi, banyaknya biji yang mati akibat respirasi air dari dalam biji yang terlalu cepat. Suhu yang dikehendaki tanaman kedelai antara 21-34° C, akan tetapi suhu optimum bagi pertumbuhan tanaman kedelai 23-27° C. Pada proses perkecambahan benih kedelai memerlukan suhu yang cocok sekitar 30° C (Adisarwanto, 2005).

Tanaman kedelai mempunyai akar tunggang yang membentuk akar-akar cabang yang tumbuh menyamping (horizontal) tidak jauh dari permukaan tanah. Jika kelembapan tanah turun, akar akan berkembang lebih ke dalam agar dapat menyerap unsur hara dan air. Pertumbuhan ke samping dapat mencapai jarak 40 cm, dengan kedalaman hingga 120 cm. Selain berfungsi sebagai tempat bertumpunya tanaman dan alat pengangkut air maupun unsur hara, akar tanaman kedelai juga merupakan tempat terbentuknya bintil-bintil akar (Anonim, 2013).

2.2 Kultur Jaringan Tanaman

Kultur Jaringan adalah teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur

tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utamanya adalah perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman, menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril.

Dasar teori yang digunakan adalah teori totipotensi yang ditulis oleh Schleiden dan Schwann yang menyatakan bahwa teori totipotensi adalah bagian tanaman yang hidup mempunyai totipotensi, kalau dibudidayakan di dalam media yang sesuai, akan dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman yang sempurna. Totipotensi adalah potensi atau kemampuan dari sebuah sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman secara utuh jika distimulasi dengar benar dan sesuai. Implikasi dari totipotensi adalah bahwa semua informasi tentang pertumbuhan dan perkembangan suatu organisme terdapat di dalam sel. Meskipun secara teoritis seluruh sel bersifat totipotensi, tetapi yang mengekspresikan keberhasilan terbaik adalah sel yang meristematik (Pratiwi *et al*., 2009).

Kultur jaringan merupakan suatu teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman yang hidup yang mempunyai perangkat fisiologi dan informasi genetik yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman yang utuh jika berada dalam kondisi yang sesuai. Keuntungan pengadaan bibit melalui kultur jaringan yakni diperoleh bahan tanaman yang unggul dalam jumlah banyak dan seragam, selain itu dapat diperoleh biakan steril (*mother stock*) sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk perbanyakan selanjutnya (Lestari, 2011).

Menurut George dan Sherrington (1984) yang dikutip dalam Lestari (2011) bahwa keberhasilan pembiakan tanaman dengan teknik kultur jaringan tergantung pada

beberapa faktor, antara lain eksplan, komposisi media tumbuh, genotipe tanaman, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh.

2.3.1 Eksplan

Umur fisiologi, umur ontogenik, ukuran eksplan, serta bagian tanaman yang diambil merupakan hal yang harus dipertimbangkan dalam memilih eksplan yang akan digunakan sebagai bahan awal kultur. Umumnya bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan merupakan jaringan muda yang aktif tumbuh. Jaringan tanaman yang masih muda mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, sel aktif membelah diri, dan relatif bersih (Yusnita, 2003).

Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah biji atau bagian-bagian biji seperti aksis embrio atau kotiledon, tunas pucuk, potongan batang satu buku (nodul eksplan), potongan akar, potongan daun, potongan umbi batang , umbi akar, empulur batang, umbi lapis dengan dan bagian batang, dan bagian bunga (Gunawan, 1995 yang dikutip oleh Yusnita, 2003).

2.3.2 Media Kultur

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan (Yusnita, 2003). Kesuksesan kultur jaringan sangat ditentukan dan tergantung oleh pilihan media yang digunakan (Santoso dan F. Nursandi, 2001)

Pada prinsipnya media untuk kultur jaringan terdiri dari campuran garam-garam anorganik, karbon sebagai sumber energi, vitamin, dan ZPT. Unsur hara makro

dan mikro yang dibutuhkan tanaman terdapat dalam bentuk garam-garam anorganik (Hardjo, 1994). Tanaman normal melakukan sintesis vitamin untuk pertumbuhan dan perkembangan (Santoso dan F. Nursandi, 2001). Vitamin yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah dari kelompok vitamin B, yaitu thiamin-HCL (vitamin B1), piridoksin-HCL (vitamin B6) atau nikotinat, dan riboflavin (vitamin B2) (Yusnita, 2003).

Unsur-unsur organik yang dibutuhkan tanaman *in vitro* sama dengan yang dibutuhkan tanaman di lapang. Unsur-unsur anorganik meliputi unsur hara makro N, P, K, Ca, Mg, dan S, serta unsur mikro seperti Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, dan Mo (Santoso dan F. Nursandi, 2001).

Dalam metode kultur *in vitro* dikenal beberapa macam jenis media dasar diantaranya media Murashige dan Skoog (MS), Gamborg (B5), Schenk dan Hildebrant (media SH), WPM (Woody plant medium), Nitsch dan Nitsch, Knop, White, Knudson dan media Vacin and Went. Media B5 pertama kali dikembangkan untuk kultur kalus kedelai dengan konsentrasi nitrat dan amonium lebih rendah dibandingkan media MS (Pratiwi *et al*., 2009).

Keasaman (pH) media mempengaruhi kelarutan, penyerapan hara atau zat tumbuh dari media oleh eksplan, dan efisiensi gel dari agar. pH media harus diatur sedemikian rupa sehingga kelarutan garam tidak terganggu (George dan Sherrington, 1984). Pierik (1987) menyarankan pH media untuk pertumbuhan tanaman dalam kultur *in vitro* berkisar 5,0-6,5.

2.3.3 Zat Pengatur Tumbuh

Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tanaman sangat penting, yaitu untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan dan Perkembangan tunas dan akar serta pembentukan kalus. Ada dua golongan zat pengatur tumbuh tanaman yang sering digunakan dalam kultur jaringan, yaitu sitokinin dan auksin. Yang termasuk golongan sitokinin antara lain BA (benzil adenin), kinetin (furfuril amino purin), 2-Ip (dimethyl allyl amino purin), thidiazuron, dan zeatin. Yang termasuk dalam golongan auksin antara lain IAA (indole acetic acid), NAA (naphtalene acetic acid), IBA (indole butiric acid), 2.4-D (2.4-dichlorophenoxy acetic acid), dicamba (3,6-dicloro-o-anisic acid), dan picloram (4-amino-3,5,6-tricloropicolinic acid). Penggunaan zat pengatur tumbuh di dalam kultur jaringan tergantung pada arah pertumbuhan jaringan tanaman yang diinginkan. Untuk pembentukan tunas pada umumnya digunakan sitokinin sedangkan untuk pembentukan akar atau pembentukan kalus digunakan auksin (Lestari, 2011).

Zat pengatur tumbuh jenis sitokinin perlu ditambahkan pada media Murashige Skoog (MS) (Tabel 4) untuk inisiasi tunas adventif. Sitokinin berperan dalam pengaturan pembelah sel, morfogenesis, differensiasi sel, merangsang pembentukan tunas adventif, mutiplikasi tunas aksilar dan melawan dominansi apikal. Jenis sitokinin yang pada umumnya digunakan adalah benziladenin (BA) karena mempunyai efektifitas tinggi dalam perbanyakan tunas, mudah diperoleh dan relatif murah.

Penggunaan zat pengatur tumbuh di dalam kultur jaringan tergantung pada arah pertumbuhan jaringan tanaman yang diinginkan. Untuk pembentukan tunas pada umumnya digunakan sitokinin sedangkan untuk pembentukan akar atau pembentukan kalus digunakan auksin. Namun demikian, sering pula dibutuhkan keduanya tergantung pada perbandingan/ratio sitokinin terhadap auksin atau sebaliknya. Adanya salah satu zat pengatur tumbuh tertentu dapat meningkatkan daya aktivitas zat pengatur tumbuh lainnya. Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk masing-masing tanaman tidak sama karena tergantung pada genotipe serta kondisi fisiologi jaringan tanaman (Lestari, 2011).

Pengulturan dengan media yang ditambah sitokinin bertujuan untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata tunas samping dan mencegah dominansi apikal yang mengakibatkan terbentuknya tunas samping. Sitokinin dapat merangsang pembentukan tunas adventif, multiplikasi tunas aksilar dan melawan dominansi apikal (Yusnita, 2003).

Menurut Lestari (2011), penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tergantung pada jenis tanaman yang digunakan serta tujuan kegiatan. Untuk pembentukan tunas umumnya menggunakan zat pengatur tumbuh sitokinin (BA atau kinetin), untuk pembentukan kalus menggunakan auksin 2.4-D dan untuk pembentukan akar menggunakan auksin (IAA, IBA, atau NAA). Pada tanaman tertentu sering pula digunakan kombinasi sitokinin dan auksin tergantung tujuan pembentukan tunas, akar atau kalus. Perimbangan sitokinin terhadap auksin atau sebaliknya dapat mengarahkan proses morfogenesis.

2.3.4 Genotipe

Keberhasilan regenerasi tanaman sangat tergantung pada genotipe yang digunakan (Barwale *et* al., 1986 dikutip oleh Pardal, 2002). Belum tentu semua sel atau tanaman dapat dimanipulasi secara *in vitro*. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kemampuan daya tumbuh atau regenerasi dari masing-masing jenis sel dan genotipe tanaman (Pardal, 2002). Masing-masing jenis eksplan atau sel dan genotipe tanaman memerlukan komposisi media yang berbeda-beda (Pierik, 1987).

2.4 Regenerasi *in vitro* Kedelai

Kedelai merupakan salah satu jenis tanaman yang masih sulit dimanipulasi secara *in vitro*, karena tanaman ini bersifat rekalsitran. Meskipun telah banyak dilaporkan keberhasilan regenerasi tanaman pada kedelai, ternyata masih sulit diulang oleh peneliti lain (*tidak reproducible*). Keberhasilan regenerasi tanaman kedelai sangat tergantung pada genotipe yang digunakan (Barwale *et al*., 1986).

Perbanyakan tanaman kedelai dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan beberapa cara yakni pengulturan dengan setek satu buku, tunas samping, dan metode pembiakkan dengan jalur organogenesis dan embriogenesis. Pada jalur organogenesis dan embriogenesis, eksplan dirangsang pertumbuhannya untuk membentuk tunas atau embrio secara adventif, baik secara langsung (tidak melalui pembentukan kalus) maupun tidak langsung (melalui pembentukan kalus). Eksplan yang sebelumnya tidak mempunyai titik tumbuh (meristem)

dikondisikan sedemikian rupa sehingga membentuk organ atau embrio baru (George dan Sherrington, 1984).

Morfogenesis tunas/organogenesis merupakan proses pembentukan dan perkembangan tunas dari jaringan meristem tunas. Tunas selanjutnya dapat diakarkan untuk mendapatkan tanaman utuh. Embriogenesis somatik merupakan proses regenerasi tanaman melalui pembentukan struktur menyerupai embrio (*embrioid*) dari sel-sel somatik yang telah me-miliki calon akar dan tunas (serupa embrio zigotik). Tanaman utuh diperoleh dari hasil perkecambahan embrio somatik tersebut (Barwale *et al*., 1986).

Embrio somatik berguna dalam perbanyakan masal tanaman berumur panjang. Embrio somatik kedelai dapat diproduksi melalui embriogenesis menggunakan eksplan menggunakan kotiledon muda (Lippmann dan Lippmann,1984; Pardal *et al.*, 1997; Hiraga *et al.*, 2007; Loganthan *et al.*, 2010), hipokotil (Gamborg *et al.*, 1983; Phillips dan Collins, 1981), dan biji masak (Widoretno *et al.*, 2002).

2.5 Organogenesis Kedelai

Organogenesis adalah proses terbentuknya organ seperti tunas atau akar, baik secara langsung dari permukaan eksplan atau secara tidak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu (Gunawan, 1988). Morfogenesis tunas dilaporkan pertama kali oleh Wright *et al*. (1986), mereka menjelaskan tunas-tunas dapat diperoleh secara *de novo* dari eksplan buku kotiledon kecambah kedelai. Jaringan meristem tunas terbentuk di bawah jaringan epidermis dan morfogenik dapat berpoliferasi pada media yang mengandung BA (Pardal, 2002).

Kultur *in vitro* kedelai dapat dilakukan melalui proses organogenesis atau pembentukan tunas adventif dari eksplan. Tunas adventif adalah tunas yang terbentuk melalui kalus atau tidak melalui kalus dan keluar dari tempat yang bukan biasanya (ketiak atau buku). Tempat yang tidak biasanya, seperti kalus, hipokotil, internode (daerah antarbuku) batang muda. Pembentukan tunas adventif tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus terlebih dahulu (Gunawan, 1995).

Tunas merupakan bakal cabang yang telah membentuk ≥1 daun trifoliat. Tunas adventif dapat dibedakan dengan tunas aksilar. Tunas aksilar dapat terbentuk secara langsung (tanpa melalui fase kalus) dari meristem aksilar. Tunas aksilar biasanya sudah terbentuk 7 hari setelah tanam (hst) berupa tunas tunggal yang tumbuh cepat karena tanpa melalui fase kalus. Sebaliknya, tunas adventif terbentuk dari kalus yang berasal dari meristem aksilar yang dicacah. Pencacahan tersebut bertujuan untuk menghindari terbentuknya tunas aksilar dan merangsang terbentuknya tunas adventif (Utomo, 2010).

Menurut Gunawan (1988), kalus merupakan kumpulan sel *amorphous* yang terbentuk dari sel yang membelah terus menerus. Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman, tetapi organ yang berbeda menunjukkan pembelahan sel yang berbeda. Embrio muda, hipokotil, kotiledon, dan batang muda merupakan bagian tanaman yang mudah terdeferensiasi dan menghasilkan kalus. Kemampuan pembentukan kalus tergantung genotipe, ZPT, komposisi medium nutrisi, dan lingkungan tumbuh (Pierik, 1987).

Tunas dapat diinduksi melalui organogenesis dengan menggunakan eksplan buku kotiledon (*cotyledonary nodes*) (Cheng *et al*., 1980; Wright et al., 1986; Utomo, 2005; Marveldani *et al.*, 2007), daun muda (Kim *et al*., 1990), poros embrio (McCabe *et al*., 1988), potongan hipikotil (Dan dan Reichart, 1998), belahan benih masak yang diimbibisi (Paz *et al*., 2006; Joyner *et al*., 2010).

Marveldani *et al.* (2007) meregenerasikan tiga varietas kedelai menggunakan eksplan buku kotiledon (*cotyledonary nodes*). Konsentrasi BA yang terbaik untuk regenerasi tiga varietas kedelai tersebut adalah 0,75 mg/l. Eksplan dikulturkan pada media MS yang ditambahkan BA sesuai perlakuan percobaan. Persentase eksplan membentuk tunas tertinggi ditunjukkan oleh varietas Ijen sebesar 77,5% dan rata-rata jumlah tunas per eksplan tertinggi ditunjukkan oleh varietas Sinabung yaitu sebanyak 5 tunas per eksplan.

Joyner *et al*. (2010) melaporkan induksi kalus dan organogenesis pada kedelai menggunakan eksplan belahan benih masak melalui perlakuan dengan berbagai konsentrasi 2,4-D dan NAA, digunakan sendiri atau dalam kombinasi konsentrasi 2,4-D pada 3-21 µM dalam media kultur yang menghasilkan 100% induksi kalus dari kotiledon. Setelah kalus terbentuk, kultur tersebut ditumbuhkan pada media kultur BAP dan kinetin untuk mendapatkan akar dan tunas. Media kultur yang paling efektif untuk tujuan tersebut adalah 5 µM BAP.

2.6 Imbibisi dan Perkecambahan Biji

Imbibisi merupakan proses masuknya air karena adanya perbedaan konsentrasi, yaitu dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Imbibisi pada tumbuhan

umumnya terjadi pada proses penyerapan unsur-unsur yang dibutuhkan oleh tumbuhan khususnya air. Imbibisi merupakan proses awal masuknya air pada biji, sehingga terjadi proses perkecambahan. Sedangkan perkecambahan merupakan tahap awal perkembangan suatu tumbuhan, khususnya tumbuhan berbiji. Dalam tahap ini, embrio di dalam biji yang semula berada pada kondisi dorman mengalami sejumlah perubahan fisiologis yang menyebabkan embrio tersebut berkembang menjadi tumbuhan muda. Tumbuhan muda ini dikenal sebagai kecambah (Lakitan, 1996).

Imbibisi merupakan penyerapan air oleh imbiban, contohnya penyerapan air oleh benih dalam proses awal perkecambahan, benih akan membesar, kulit benih pecah, berkecambah, dilandasi oleh keluarnya radikula dari dalam benih. Syarat imbibisi yaitu perbedaan tekanan antara benih dengan larutan, dimana tekanan benih lebih kecil dari pada tekanan larutan, ada daya tarik-menarik yang spesifik antara air dan benih. Benih memiliki partikel koloid yang merupakan matriks, bersifat hidrofil berupa protein, pati, sellulose, dan benih kering memiliki tekanan sangat rendah (Anonim, 2008).

Banyaknya air yang dihisap selama proses imbibisi umumnya kecil, cepat dan tidak boleh lebih dari 2-3 kali berat kering dari biji. Ahli fisiologi benih menyatakan ada empat tahap proses fisiologi benih yakni hidrasi atau imbibisi (selama kedua periode tersebut, air masuk kedalam embrio dan membasahi protein dan koloid lain), pembentukan atau pengaktifan enzim, yang menyebabkan peningkatan aktivitas metabolik, pemanjangan sel radikal, diikuti munculnya radikula dari biji, dan pertumbuhan kecambah selanjutnya. Lapisan

yang membungkus embrio yaitu endosperm, kulit biji dan kulit buah (Salisbury dan Ross, 1992).

Perkecambahan adalah proses pertumbuhan embrio dan komponen-komponen biji yang memiliki kemampuan untuk tumbuh secara normal menjadi tanaman baru. Komponen biji adalah struktur lain di dalam biji yang merupakan bagian kecambah, seperti calon akar (*radicula*), calon daun, batang (*plumule*) dan sebagainya. Pada proses perkecambahan, biji membutuhkan air dalam jumlah minimum dalam tubuhnya, atau yang disebut dengan taraf kandungan minimum. Jika kandungan air benih kurang dari batas tersebut akan menyebabkan proses perkecambahan terganggu. Fungsi utama cadangan makanan dalam biji adalah memberi makan pada embrio atau tanaman yang masih muda sebelum tanaman itu dapat memproduksi sendiri zat makanan, hormon, dan protein (Anonim, 2008).

2.7 Pengakaran dan Aklimatisasi Tanaman Kedelai

Salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan aklimatisasi adalah perakaran. Akar yang makin banyak dan panjang akan meningkatkan bidang serapan hara. Perakaran dengan kualitas yang baik juga sangat menentukan keberhasilan dalam tahap aklimatisasi. Untuk itu formulasi media yang tepat sangat menentukan kualitas akar. Pembentukan akar dari tunas *in vitro* pada tanaman tertentu sangat cepat contohnya pada tembakau, mentimun, nilam, dan beberapa kultur lainnya. Akar tersebut dapat dihasilkan pada media yang sama untuk pertunasan. Namun pada tanaman tertentu pembentukan akarnya sangat sulit sehingga diperlukan media tumbuh baru yang mengandung auksin. Pada tanaman inggu, penggunaan IAA 1 mg/l menghasilkan akar terbanyak

dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pada tanaman Tangguh menggunakan media MS + NAA 1 mg/l dapat dihasilkan akar (Lestari *et al.*, 1999 dikutip oleh Lestari , 2011). Singh *et al.* (2013) melaporkan bahwa pengakaran tunas terbaik dari hasil regenerasi *in vitro* dari eksplan kotiledon pomegranate (*Punica granatum* L.) diperoleh pada media setengah MS yang diformulasikan dengan 0,5 mg/l NAA + 200 mg/l arang aktif.

Kegiatan penelitian yang melibatkan kultur *in vitro*, misalnya dalam perakitan tanaman transgenik, selain memerlukan sistem regenerasi yang konsisten dan teknik transformasi yang efektif dan efisien, juga perlu menguasai teknik aklimatisasi tanaman (Slamet *et al.*, 2005). Aklimatisasi merupakan tahapan paling kritis dan sulit pada proses regenerasi tanaman secara *in vitro*. Kegagalan aklimatisasi tanaman merupakan kendala yang banyak dijumpai di Indonesia. Oleh karena itu, tahapan ini memerlukan pengalaman dan penanganan yang penting karena aklimatisasi adalah mengadaptasikan planlet dari media kultur *in vitro* ke media tanah pada ruangan terbuka (Pardal *et al.*, 2005).

Keberhasilan aklimatisasi kedelai ditentukan oleh berbagai faktor. Secara umum, faktor-faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan aklimatisasi tanaman kedelai adalah kondisi planlet (ukuran bibit, perakaran), kondisi lingkungan (ketepatan media tumbuh yang digunakan dan kelembapan udara), ketepatan perlakuan pra dan pasca transplantasi dari media *in vitro* ke media tanah, dan sanitasi lingkungan dari infeksi penyakit. Kedelai adalah tanaman rekalsitran dan sensitif terhadap lingkungan. Salah satu kendala dalam perakitan kedelai unggul transgenik adalah kegagalan aklimatisasi. Oleh karena itu, untuk menghindari

kehilangan kandidat putatif transgenik yang memiliki sifat tertentu, sebelum diaklimatisasi perlu dilakukan perbanyakan secara *in vitro* (Slamet *et al.*, 2005).