

Evaluasi Embrio Somatik Galur Mutan Kedelai dari Kotiledon Muda pada Dua Media Induksi Kalus Embrionik

Yuliasti dan Arwin

Center for Application of Isotopes and Radiation, National Nuclear Energy Agency Jl. Lebak Bulus Raya No. 49
Jakarta 12440; E-mail: upikyuliasti@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan media yang sesuai dalam pembentukan ES galur mutan kedelai dan beregenerasi membentuk planlet. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap, terdiri dari dua faktor yaitu enam galur mutan dengan satu varietas kontrol dan dua kombinasi hormon dengan medium MS. Penelitian ini terdiri dari 10 ulangan setiap ulangan terdiri dari lima eksplan. ES primer diinduksi dari ekplan kotiledon muda galur mutan kedelai dengan kombinasi media Murhashige dan Skoog (MS) dengan (10 mg/l 2,4-D & 10 mg/l NAA) dan 40 mg/l 2,4-D. ES sekunder induksi dari ES primer menggunakan modifikasi media MS dengan 10 mg/l 2,4-D dengan 10 mg/l NAA. Media pembentukan plantlet menggunakan MS dengan arang aktif. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi media MS dengan 10 mg/l 2,4-D and 10 mg/l NAA membentuk ES primer dari enam galur mutan kedelai, sementara kombinasi media MS dengan 2,4-D at 40 mg/l, dapat membentuk ES primer dari empat galur mutan kedelai. Hanya tiga galur mutan kedelai yang mampu beregenerasi membentuk planlet (tanaman) pada kombinasi media MS dengan arang aktif.

Kata kunci: kotiledon muda, embrio somatik, galur mutan kedelai

ABSTRACT

Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean mutant lines on two medium embryonic calus. To examine the capacity for plant regeneration through somatic embryogenesis, soybean mutant lines were investigated by 3-step-somatic embryogenesis: 1) induction of somatic embryos (SEs) from immature cotyledons, 2) proliferation of SEs in medium and 3) differentiation of SEs into cotyledon-stage embryos. The objectives of this research was to obtain suitable medium for inducing somatic embryos (SE) and plant regeneration of soybean mutant lines using two medium. The experiment consisted of two factors and was arranged in a randomized complete design with ten replications. The first factor was soybean mutant lines (six mutant lines and one cultivars as control). The second factor was two combination hormones with MS medium induction SE primary. Result of the experiment showed that primary somatic embryos (SE) can be induced from immature embryos cotyledon of six soybean mutant lines and one variety on MS medium containing a combination of 10 mg/l 2,4-D and 10 mg/l NAA and 40 mg/l 2,4-D . Secondary SE was induced from primary SE on modified MS medium containing 10 mg/l 2,4-D and 10 mg/l NAA. Some soybean mutant lines have high competence for somatic embryogenesis on solid media containing 10 mg l⁻¹ 2,4-D and 10 mg l⁻¹ naphthaleneacetic acid. Soybean plantlets were regenerated by culturing secondary somatic embryos on maturation medium MS containing 1 g/l activated charcoal for one month. In this study response to somatic embryos formation was obtained on six soybean mutant lines using MS medium combination of 10 mg/l 2,4-D and 10 mg/l NAA. Meanwhile, MS medium containing 2,4-D at 40 mg/l induced somatic embryos on four soybean mutant lines, however only three mutant lines were able to form plantlet.

Keywords: immature embryo, embrio somatic, soybean mutant lines

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* Merr.) merupakan komoditas pangan penting setelah padi dan jagung. Kebutuhan kedelai di Indonesia terus meningkat seiring dengan peningkatan jumlah penduduk. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2015) menunjukkan, sekitar 60% pemenuhan kebutuhan kedelai dalam negeri pada tahun 2015 berasal dari impor. Sebelumnya Indonesia harus mengimpor 1.3 juta ton kedelai. Rata-rata kebutuhan kedelai setiap tahun mencapai $\pm 2,2$ juta ton biji kering, sedangkan produksi dalam negeri saat ini 954 ton. Sekitar 90% produksi kedelai nasional dihasilkan oleh 10 provinsi, yaitu NAD, Sumsel, Banten, Jabar, Jateng, DIY, Jatim, NTB, Sulteng, dan Sulsel.

Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi kedelai nasional adalah melalui pemuliaan secara mutasi untuk memperbaiki karakter tanaman yang diinginkan, termasuk produktivitas. Induksi mutasi mampu menghasilkan mutan dengan tingkat keragaman pada banyak karakter yang bisa diseleksi. Induksi mutasi bertujuan untuk meningkatkan laju frekuensi mutasi sehingga diperoleh varian dengan tingkat keragaman yang tinggi yang akan diseleksi sesuai dengan karakter yang diinginkan. Dalam pemuliaan tanaman mutasi induksi dapat mengembangkan galur mutan yang kemudian diidentifikasi karakter gen spesifiknya dalam rangka membangun *database* gen, untuk studi molekular yang berkaitan dengan fungsi genomik dan pengembangan bioinformatika untuk menghasilkan varietas yang dapat tumbuh di bawah kondisi perubahan iklim. Induksi mutasi dapat dilakukan dengan menggunakan mutagen kimia dan fisik. Iradiasi sinar gamma merupakan salah satu jenis mutagen fisik yang biasa digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik berbagai tanaman. Perlakuan mutagen akan merusak DNA dan selama proses perbaikan DNA akan terjadi mutasi baru yang diinduksi secara acak. Perubahan dapat terjadi pada organel pada sitoplasma maupun mutasi kromosom inti (Jain 2010).

Keragaman genetik yang tinggi merupakan salah satu faktor penting dalam perbaikan sifat tanaman. Varietas unggul baru dapat diperoleh dengan mendatangkan dari luar negeri tetapi memerlukan waktu adaptasi dan seleksi yang relatif lama dan umumnya lebih rentan terhadap hama dan penyakit setempat. Persilangan varietas introduksi dengan varietas lokal seringkali tidak efisien karena kendala inkompatibilitas seksual. Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah teknik kultur *in vitro*. Perbaikan tanaman secara *in vitro* dilakukan antara lain melalui keragaman somaklonal. Keragaman somaklonal dapat dilakukan menggunakan mutagen fisika seperti sinar gamma kimia (Cheng *et al.* 2010; Damayanti dkk. 2011).

Pemanfaatan teknologi kombinasi teknik mutasi secara *in vitro* telah banyak dilakukan dalam perakitan varietas kedelai. Teknik keragaman somaklonal seringkali dikombinasikan dengan mutasi buatan untuk meningkatkan peluang diperolehnya galur-galur harapan yang diinginkan. Teknik tersebut dapat mempercepat diperolehnya galur-galur baru dengan berbagai sifat atau karakter yang diinginkan (Youchang Li dan Liang 1997). Keunggulan lain dari metode *in vitro* dalam seleksi, keragaman lingkungan dapat diminimalkan dengan pengaturan hara media dan keseragaman aplikasi cekaman, serta dapat dilakukan untuk seleksi dalam populasi yang besar (Hassanein 2010), bahkan sampai jutaan genotipe apabila dikombinasikan dengan iradiasi (Husni *et al.* 2006). Keberhasilan metode kultur *in vitro* bergantung pada eksplan membentuk embrio somatik (ES) dan beregenerasi menjadi tanaman. Regenerasi kedelai secara *in vitro* dapat dilakukan melalui embriogenesis somatik (Kumari *et al.* 2006). Berbagai bagian tanaman dapat digunakan,

antara lain kotiledon muda, daun, batang, embrio muda dan anter. Regenerasi kedelai melalui embriogenesis somatik merupakan proses yang panjang dan sangat bergantung kepada genotipe yang digunakan. Keberhasilan regenerasi kedelai melalui embriogenesis somatik bergantung pada komponen utama yang harus dikuasai.

Induksi embrio somatik (ES) primer pada kedelai dapat dilakukan langsung dari eksplan kotiledon muda pada medium yang mengandung 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) atau α -naphthaleneacetic acid (NAA.) dan kombinasi 2,4-D dengan NAA. Pembentukan ES secara berkelanjutan melalui induksi ES sekunder dari kalus embriogenik atau ES primer merupakan teknik *in vitro* yang diinginkan agar dapat lebih efektif menghasilkan varian somaklonal dan teknologi transformasi genetik (Husni *et al.* 2006). Genotipe kedelai yang mempunyai kemampuan membentuk embrio somatik primer dan membentuk embrio somatik sekunder (proliferasi) yang mampu kembali menjadi tanaman yang lengkap merupakan genotipe yang potensial (Mariska 2002). Induksi ES menjadi planlet (tanaman) pada kedelai merupakan informasi dasar yang diperlukan untuk pengembangan bioteknologi antara lain seleksi abiotik dan biotik stress secara *in vitro* serta tranformasi genetik (Ko *et al.* 003). Embrio somatik dapat disimpan lebih dari satu tahun dan dapat digenerasikan menjadi tanaman bila diperlukan.

Penelitian bertujuan: (1) untuk mengevaluasi respons galur mutan kedelai terhadap pembentukan embrio somatik primer dan sekunder yang diinduksi dalam media MS, (2) mengevaluasi kemampuan embrio somatik sekunder menjadi planlet.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agonomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor mulai Oktober 2005 sampai Juni 2006.

Penyiapan Media Kultur Embrio Somatik

Media perlakuan untuk induksi kalus embriogenik primer dan embrio somatik sekunder yaitu MSD40 yang terdiri dari media dasar MS (Murashige dan Skoog) yang ditambahkan vitamin B5 (Gamborg), sukrosa 15 g/l, agar 8 g/l untuk pemat, myoinositol 0,1 g/l, 40 mg/l 2,4-D dan MSND10 yaitu kombinasi NAA dengan 2,4-D masing-masing 10 mg/l. Media untuk proliferasi (perkecambahan) kalus embriogenik sekunder yaitu MSBP, terdiri dari media dasar MS yang ditambahkan vitamin B5 (Gamborg), sukrosa 30 g/l agar 8 g/l sebagai pemat, myoinositol 0,1 g/l dan BAP 2 mg/l. Media pembentukan plantlet yaitu MSB, yang terdiri dari media dasar MS ditambahkan vitamin B5 (Gamborg), sukrosa 30 g/l agar 8 g/l untuk pemat, myoinositol 0,1 g/l dan arang aktif 1 g/l. Media masing-masing memiliki pH 5,8. Botol kultur dan media yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 17,5 psi.

Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Benih tujuh genotipe tanaman kedelai (G1, G2, G3, G4, G5 G6, dan varietas Rajabasa) ditanam pada pot (1 pot/genotipe). Kurang lebih 15 hari setelah antesis, polong muda sudah terbentuk dan diambil sebagai eksplan dengan ukuran 4–5,5 mm. Kotiledon yang dipilih adalah yang muda dan bewarna hijau. Polong tanaman disterilisasi dengan alkohol 96%. Polong direndam dalam larutan alkohol 96% selama 10 detik, kemudian direndam kembali dalam bayclin (dengan bahan aktif 5,25% NaClO) selama 8 menit.

Kotiledon muda diambil dan dibuang kulit arinya, selanjutnya dipotong sedikit ujung dan pangkalnya. Setelah itu kotiledon diletakkan pada media induksi kalus embrionik.

Induksi Embrio Somatik (ES) Primer dari Eksplan Kotiledon

Masing-masing kotiledon muda dari tiap genotipe kedelai ditanam pada media induksi embriosomatik primer (MSD40 dan MSND10) diletakkan dalam ruang kultur pada suhu 25 °C dengan pencahayaan 1.000 lux selama 24 jam. Eksplan dikulturkan dalam media induksi selama 4 minggu. Setelah 4 minggu ES primer dipindah pada media yang sama.

Induksi ES Sekunder

Untuk menginduksi pembentukan ES sekunder, setiap ES primer yang terbentuk dipisahkan dari eksplan kotiledon dan dikulturkan dalam media induksi ES yang sama (MSD40 dan MSND10). ES primer dipelihara selama satu bulan hingga terbentuk ES sekunder. Kultur diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25 °C dengan pencahayaan 1.000 lux selama 24 jam.

Proliferasi (Perkecambahan) ES Sekunder dan Regenerasi menjadi Planlet

ES sekunder yang terbentuk setelah empat minggu dalam media induksi ES dikulturkan dalam media MSBP selama satu bulan agar terjadi perkembangan ES sekunder yang sempurna, yaitu ES dengan kotiledon dan radikula yang normal.

Pendewasaan dan perkecambahan struktur embrio somatik dilakukan dengan subkultur struktur embrio somatik yang masih hidup ke media MSBP sampai struktur tersebut berkecambah membentuk plantlet selama 4 minggu. ES yang berhasil berkecambah menjadi plantlet disubkultur pada media MSB. Efektivitas perkecambahan ditentukan berdasarkan frekuensi terbentuknya akar primer dan munculnya daun primer dari ES yang bertahan hidup dalam proses regenerasi membentuk plantlet. Plantlet dipelihara sampai memiliki daun dan akar yang sempurna selama 4 minggu. Kultur diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25 °C dengan pencahayaan 1.000 lux selama 24 jam.

Metode Penelitian

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah genotipe enam galur mutan kedelai dari BATAN (G1, G2, G3, G4, G5 dan G6) dan satu varietas kedelai Rajabasa. Faktor kedua adalah media perlakuan untuk induksi kalus embrionik primer dan embrio somatik sekunder, yaitu MSD40 yang terdiri dari media dasar MS yang ditambahkan vitamin B5 (Gamborg), sukrosa 15 g/l, agar 8 g/l untuk pemat, myoinositol 0,1 g/l, 40 mg/l 2.4-D dan MSND10, yaitu kombinasi NAA dengan 2.4-D masing-masing 10 mg/l. Setiap perlakuan diulang 10 kali.

Pengamatan dan analisis. Pengamatan induksi kalus embrionik dilakukan pada 4 minggu setelah tanam terhadap persentase eksplan membentuk ES primer dan warna kalus. Selain itu, dengan menggunakan mikroskop, diamati tahap embrio somatik yang terbentuk. Pengamatan perkembangan ES sekunder dilakukan setelah ES primer 4 minggu ditanam dalam media induksi ES sekunder. Parameter yang diamati: persentase eksplan ES primer membentuk ES sekunder. Pengamatan persentase ES sekunder yang berkecambah diamati setelah ES sekunder 4 minggu ditanam dalam media perkecambahan dan pengamatan persentase perkecambahan ES sekunder menjadi plantlet pada media regenerasi.

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan prosedur Anova. dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf nyata 5%. Analisis dilakukan menggunakan program SAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis ragam memperlihatkan interaksi genotipe kedelai dengan media berpengaruh nyata terhadap pembentukan embrio somatik (ES) primer. Sebanyak tujuh genotipe kedelai yang dievaluasi mampu membentuk ES primer dalam media induksi MSND10. Hanya tiga galur mutan yang dapat membentuk ES sekunder yaitu G1, G2 dan G4 (Tabel 1).

Respons galur mutan dalam media induksi ES 2.4-D 40 mg/l cenderung menginduksi ES secara tidak langsung melalui fase kalus yang bersifat embriogenik dan nonembriogenik. Kotiledon yang dikulturkan membentuk kalus embriogenik yang ditandai oleh terbentuknya kalus berwarna kuning, selanjutnya berkembang membentuk struktur globular sebagai tahapan awal pembentukan ES. Kombinasi NAA dengan 2.4-D cenderung menginduksi embrio somatik secara langsung tanpa pembentukan kalus. Embrio yang dihasilkan relatif normal dan mudah dikedambahkan tetapi jumlahnya sedikit. Galur mutan G3 memberikan respons terbaik dalam pembentukan embriosomatik primer yang ditanam dalam media kombinasi MSND10. Sebaliknya, dalam media dengan MSD40, galur mutan G3 tidak dapat membentuk ES primer. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan ES primer yang terinduksi dalam media kombinasi NAA +2.4-D masing-masing 10 mg/l, berasal dari jaringan epidermis sepanjang ujung distal eksplan kotiledon. Sebaliknya pada media 2.4-D 40 mg/l, ES primer terbentuk dari jaringan eksplan yang lebih luas (Susumu *et al.* 2007). Induksi embrio somatik dari kultur kotiledon kedelai menggunakan media MS modifikasi vitamin B5 (Gamborg) dengan penambahan hormon auksin NAA dan 2.4-D masing-masing 10mg/l merupakan media yang tepat induksi embrio somatik kedelai. Hormon 2.4-D merupakan auksin sintesis yang sangat aktif dan kuat, cukup tahan terhadap degradasi enzimatis dan proses konjugasi dengan senyawa lain.

Induksi Embrio Somatik Sekunder

Dari hasil pengamatan terhadap daya regenerasi sel/kalus embriogenik terhadap perlakuan media terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi 2.4-D yang digunakan maka semakin sedikit jumlah ES sekunder yang dihasilkan. Hal ini disebabkan oleh perbedaan tingkat sensitivitas genotip terhadap konsentrasi auksin eksogen atau auksin endogen yang diberikan. Induksi ES sekunder enam galur mutan dan varietas Rajabasa pada media kombinasi NAA+2.4-D masing masing 10 mg/l memberikan respons yang sangat baik. Penambahan kombinasi NAA 10 mg/l +2.4-D 10 mg/l kedalam medium induksi ES mampu menginduksi pembentukan ES dengan frekuensi yang tinggi (Shoemaker *et al.* 1991) (Tabel 2). Berdasarkan analisis ragam interaksi perlakuan media dengan enam galur mutan dan varietas Rajabasa memberikan respons yang nyata dalam pembentukan ES sekunder. Pada proses proliferasi satu sel atau sekelompok kecil sel dipermukaan embrio somatik primer akan membentuk embrio somatik baru [embrio somatik sekunder], (Nadolska dan Orczyk 1994). Pada tahap proliferasi dengan menggunakan media MSND10 yang mengandung auksin 2.4-D 10 mg/l +NAA 10 mg/l menunjukkan bahwa kalus yang dikulturkan mempunyai perkembangan pertumbuhan kalus (sifat embriolik) yang lebih tinggi. Kombinasi 2.4-D dan NAA dalam medium diduga mampu menginduksi dan meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan kalus embriolik yang lebih baik.

Hofmann *et al.* (2004) menyatakan bahwa embrio somatik yang diinduksi pada media yang mengandung NAA tidak akan berproliferasi dengan baik dibanding penggunaan 2.4-D dalam media. Dengan mengkombinasikan NAA dan 2.4-D dapat menghasilkan embrio dengan morfologi normal dan 2.4-D untuk proliferasi dan pembelahan sel, diduga dapat menghasilkan embrio somatik yang lebih banyak dan mampu diregenerasikan menjadi planlet.

Tabel 1. Respons pembentukan kalus dan Embrio Somatik (ES) sekunder dari eksplan ES primer galur mutan kedelai

| Media galur | Eksplan dengan kalus kuning (%) | | Eksplan dengan kalus hijau (%) | | Eksplan dengan ES sekunder (%) | |
|-------------|---------------------------------|--------|--------------------------------|-------|--------------------------------|--------|
| | MSND10 | MSD40 | MSND10 | MSD40 | MSND10 | MSD40 |
| G1 | 8,8a | 8,6ab | 3,37ab | 2,23a | 2,4a | 1,09b |
| G2 | 4,36b | 9,26a | 4,36a | 2,74a | 2,04ab | 1,09ab |
| G3 | 9,3a | 8,67ab | 0 | 0b | 3,18a | 0 |
| G4 | 8,7ac | 8,7b | 1,41b | 0b | 2,25ab | 1,09ab |
| G5 | 8,5ab | 7,83ab | 4,10a | 0b | 1,47b | 0c |
| G6 | 7,59ab | 8,63a | 0c | 0b | 1,65b | 0 |
| RJb | 8,5a | 8,46ab | 1,65b | 0b | 2,04ab | 0 |

Keterangan: Kk = 30; Angka sekolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=5$.

Induksi Embrio Somatik Sekunder

Dari hasil pengamatan terhadap daya regenerasi sel/kalus embriogenik terhadap perlakuan media terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi 2.4-D yang digunakan maka semakin sedikit jumlah ES sekunder yang dihasilkan. Hal ini disebabkan oleh perbedaan tingkat sensitivitas genotipe terhadap konsentrasi auksin eksogen atau auksin endogen yang diberikan. Induksi ES sekunder enam galur mutan dan varietas Rajabasa pada media kombinasi NAA + 2.4-D masing-masing 10 mg/l memberikan respons yang sangat baik. Penambahan kombinasi NAA 10 mg/l + 2.4-D 10 mg/l pada medium ES mampu menginduksi pembentukan ES dengan frekuensi yang tinggi (Shoemaker *at al.* 1991) (Tabel 2). Berdasarkan analisis ragam interaksi perlakuan media dengan enam galur mutan dan varietas Rajabasa memberikan respons nyata dalam pembentukan ES sekunder. Pada proses proliferasi satu sel atau sekelompok kecil sel di permukaan embrio somatik primer akan membentuk embrio somatik baru (embrio somatik sekunder), (Nadolska dan Orczyk 1994). Pada tahap proliferasi dengan menggunakan media MSND10 yang mengandung auksin 2.4-D 10 mg/l +NAA 10 mg/l menunjukkan bahwa kalus yang dikulturkan mempunyai perkembangan kalus (sifat embrionik) yang lebih tinggi. Kombinasi 2.4-D dan NAA dalam medium diduga mampu menginduksi dan meningkatkan perkembangan kalus embrionik yang lebih baik. Hoffmann *et al.* (2004) menyatakan bahwa embrio somatik yang diinduksi pada medium yang mengandung NAA tidak berproliferasi dengan baik dibanding penggunaan 2.4-D dalam media. Mengkombinasikan NAA dan 2.4-D dapat menghasilkan embrio dengan morfologi normal dan 2.4-D untuk proliferasi dan pembelahan sel, diduga dapat menghasilkan embrio somatik yang lebih banyak dan mampu diregenerasikan menjadi planlet.

Tabel 2. Respons pembentukan kalus dan embrio somatik (ES) sekunder dari eksplan ES primer galur mutan kedelai.

| Media galur | Eksplan dengan kalus kuning (%) | | Eksplan dengan kalus hijau (%) | | Eksplan dengan ES sekunder (%) | |
|-------------|---------------------------------|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | MSND10 | MSD40 | MSND10 | MSD40 | MSND10 | MSD40 |
| G1 | 24bc | 34b | 16b | 10b | 1,09c | 2c |
| G2 | 42ab | 46ab | 32a | 18b | 8b | 2c |
| G3 | 48ab | 44ab | 0 | 0 | 4c | 0 |
| G4 | 14bc | 34b | 6c | 0 | 8b | 2c |
| G5 | 32b | 48ab | 34a | 0 | 14a | 2c |
| G6 | 36b | 64a | 12bc | 4c | 6bc | 0 |
| RJb | 64a | 60ab | 6c | 0 | 8b | 0 |

Keterangan: Kk = 30 %; Angka sekolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=5$.

Respons galur mutan G3, G5, G6, dan varietas Rajabasa pada media 2.4-D 40 mg/l tidak dapat membentuk embrio somatik sekunder. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Nadolska dan Orczyk 1994) di mana sifat 2.4-D yang mudah diserap sel tanaman, tidak mudah terurai dan menjadi tidak aktif, berfungsi sebagai auksin kuat dan mampu mendorong aktivitas morfogenetik. Konsentrasi 2.4-D antara 30-40 mg/l cenderung menghambat pembentukan embrio somatik dan mengarahkan perkembangan eksplan ke pembentukan kalus. Pemberian konsentrasi auksin yang tinggi dalam media dapat memperlambat pembentukan ES dan mengurangi pembentukan jumlah ES yang normal (Kumari *et al.* 2006).

Hasil penelitian ini menunjukkan genotipe mutan kedelai yang diuji nyata mempunyai respons yang berbeda terhadap media induksi ES. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Ko *et al.* (2003) respons genotipe kedelai terhadap pemberian 2.4-D 40 mg/l sangat berbeda. Hal senada disampaikan oleh Hofman *et al.* (2004), frekuensi embryogenesis nyata dipengaruhi oleh genotipe. Parrott *et al.* (1989) juga menyatakan bahwa genotipe memegang peranan penting dalam merespons auksin untuk menstimulasi embrio.

Perkecambahan (Regenerasi) embrio somatic membentuk Planlet

Perkembangan fase embrio akan optimum jika kultur dipindahkan ke media perkecambahan, dimana akan terjadi perubahan embrio somatik menjadi planlet. Embrio genesis dapat terjadi melalui beberapa jalur ontogeni (Hoffman *et al.* 2004). Pada media regenerasi (perkecambahan) yaitu MSB, diferensiasi embrio somatik sekunder mulai terlihat dengan terbentuknya lembaran kotiledon dan radikula tetapi jumlah embrio somatik yang berdiferensiasi tidak terlalu besar. Berdasarkan hasil penelitian, kalus dari genotipe G3, G5 dan Rajabasa yang dikulturkan pada media MSND10 dan MSD40 berhasil memproduksi embrio somatik tahap globular dan torpedo yang berwarna hijau. Schmidt *et al.* (2005) menyatakan embrio yang normal dapat ditingkatkan diantaranya dengan penggunaan sumber karbon (C) yang tepat, penambahan asam amino (glutamin dan beberapa asam amino yang lain seperti methionin atau dengan penambahan ABA (asam absisik). Modifikasi komposisi media pada kultur embriogenesis ditujukan agar embrio somatik yang berhasil diinduksi dapat berkembang secara normal dan mudah dikecambahkan menjadi planlet tanaman (Tabel 3). Rendahnya embrio somatik sekunder yang mampu berdiferensiasi diduga akibat kurangnya nitrogen organik pada medium. Fu *et al.* (1997) menyatakan bahwa perkembangan embrio kedelai dapat ditingkatkan dengan pe-

nambahan nitrogen organik seperti glutamin, asparagin dan casein hidrosalat pada media kultur. Kotiledon muda membutuhkan nitrogen organik yang tinggi selama pertumbuhannya. Untuk menginduksi tunas maupun akar dilakukan pada media MS ditambah arang aktif (MSB). Pemakaian arang aktif dalam induksi tunas maupun akar dimaksudkan selain untuk menyerap zat pengatur tumbuh (BAP) yang masih tersisa pada kecambah adalah untuk merangsang perakaran dengan mengurangi tingkat cahaya yang sampai pada eksplan (Santos *et al.* 2006). Penggunaan media tanpa auksin pada kedelai dan penambahan sukrosa 30 g/l dapat meningkatkan frekuensi pembentukan ES dengan kotiledon dan radikula sehingga siap dikecambahkan menjadi planlet (Fu *et al.* 1997). Hasil penelitian George and Sherington (1984) menunjukkan penggunaan modifikasi media cair dengan penambahan konsentrasi 2.4-D yang rendah dapat meningkatkan perkecambahan ES pada kedelai.

Hasil pengamatan terhadap daya regenerasi embrio somatik sekunder menjadi plantlet terlihat bahwa hanya dua galur mutan dan satu varietas yang mampu membentuk planlet, (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Susumu *et al.* (2007) yang menunjukkan dari sejumlah kultivar yang diuji hanya dua kultivar yang berpotensi membentuk planlet melalui regenerasi embrio somatik.

Pada tahap perkecambahan fase globular hanya dua galur mutan dan satu varietas yang dapat berkecambah membentuk planlet. Galur mutan G5 dapat menghasilkan plantlet yang lebih banyak dibanding G3 dan varietas Rajabasa (Tabel 3).

Tabel 3. Embrio somatik galur mutan kedelai yang mampu membentuk planlet dalam media perkecambahan arang aktif.

| Genotipe | Jumlah ES yang dikecambahkan | ES yang berkecambah (%) | Plantlet (%) |
|----------|------------------------------|-------------------------|--------------|
| G3 | 34 | 12b | 35,03b |
| G5 | 39 | 25a | 64,17a |
| Rajabasa | 11,3 | 3,3c | 33,3b |

Keterangan: Kk = 20; Angka sekolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5$.

Embrio galur mutan G1, G2, G4, dan G6 setelah disubkultur pada media diferensiasi dan maturasi, tidak berkecambah dan tidak berkembang. Menurut Finer (1988), sebenarnya embrio dengan warna hijau merupakan embrio yang viabel (masih aktif), tetapi setelah disubkultur pada media maturasi tidak mampu berkecambah dan tidak berkembang karena sebagian besar embrio bersifat abnormal yang tidak mempunyai perkembangan meristem tunas dan embrio somatik belum berkembang optimal. Hal tersebut terjadi karena embrio tumbuh pada kondisi yang kurang optimal.

Genotipe kedelai yang mempunyai kemampuan membentuk embrio somatik primer dan sekunder (proliferasi) serta planlet (tanaman yang lengkap) potensial untuk ditransformasi (Kita *et al.* 2006). Embrio somatik yang berkecambah pada fase globular atau torpedo tanpa melalui tahapan maturasi dapat menyebabkan terjadinya perkecambahan prematur sehingga menghasilkan planlet yang lemah atau tidak dapat menghasilkan planlet.

KESIMPULAN

Kemampuan induksi dan proliferasi embrio somatik dari eksplan kotiledon muda galur mutan kedelai dipengaruhi oleh genotipe dan jenis auksin yang digunakan. Penambahan kombinasi 2,4D dengan NAA 10 mg/l menimbulkan respons yang lebih baik dibandingkan pemberian 2,4-D 40 mg/l. Embrio somatik sekunder yang berasal dari galur mutan G5 dapat berkecambah dan menghasilkan plantlet dengan frekuensi 64,17%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Bpk Prof Dr Sudarsono MSc yang telah membantu terlaksananya penelitian ini baik moril maupun materil.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik. 2015. Badan Pusat Statistik (BPS), 2011. www.bps.go.id/tnm_pgn.php
- Cheng L., H. Yang., B. Lin., Y. Wang., W. Li., D. Wang., and F. Zhang. (2010). Effect of gamma ray radiation on physiological, morphological characters and chromosome aberrations of minitubers in *Solanum tuberosum* L. *Int. J. Radiat. Biol* 86(9): 791–799.
- Damayanti, F.I. Roostika, dan M. Masur. (2011). Induksi keragaman somaklonal pada tunas kantong semar (*Nepenthes* spp.) dengan radiasi sinar gamma secara *in vitro*. Seminas Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR-BATAN dan UPI Bandung 22 Juni 2011.
- Finer, J.J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 7: 238–24.
- Fu, Y., C. Nicolodi, L. Santini, L. Sapano and D. Marriotti, 1997. Development and germination of somatic embryos from immature soybean cotyledons: role of auksin-like compounds and organic nitrogen. *J. Genet. & Breed.* 51:341–345.
- George, E.F. and P.D. Sherington, 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegenetics Limited, England. 79 p.
- Hassanein, A.M.A. 2010. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium*. *J of Hort & Ornamental Plants* 2:8–15.
- Hoffmann, N, R. L. Nelson and S. S. Korban 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 17–163.
- Husni, A., M. Kosmiatin, dan I. Mariska. 2006. Peningkatan toleransi kedelai Sindoro terhadap kekeringan melalui seleksi *in vitro*. *Bul. Agron.* 34:25–31.
- Jain, M.S. 2010. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15:88–106.
- Kita, Y., K. Nishizawa, M. Takahashi, and M. Ishimoto. 2006. Genetic improvement of Somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-006-0254-z.
- Ko, T.S., Lee S, Krasnyanski S, Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor Appl Genet* 107: 439–447
- Kumari, BD. Ranjitha, Settu.A and Sujata.G . Somatic embryo and plant regeneration in soybean. 2006. *Indian journal of biotechnology* Vol 5. Apr 2006 pp 243–245.
- Mariska I. 2002. Peningkatan ketahanan terhadap aluminium pada pertanaman kedelai melalui kultur *in vitro*. Laporan kemajuan RUT VIII, 1, Tahap I Kementrian Riset dan Teknologi dan LIPI Jakarta.

- Murashige, T. and Skoog F. 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–493.
- Nadolska-Orczyk A., and Orczyk W 1994 . New aspects of soybean somatic embryogenesis. *Euptica*: 80:137–143.
- Parrott, W.A. G. Williams, D.F. Hildebrand, G, B. Collins, 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell, Tissue and organ Culture* 16:15–21.
- Santos, K.G, B,J.E.A. Mariath, M.C.C. Moco and M.H.B.Bodanese-Zanettini.2006. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr): Ontogeny of Somatic Embryos. *Brazilian and Archives Biology and Tech.* 49(1): 49–55.
- Schmidt, M., D.M Tucker, E.B. Cahoon, and W.A. Parrott (2005) Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. *Plant Cell Rep* 24: 383–391.
- Shoemaker, R.C., L.A. Amberger, R.G. Palmer, Oglesby L Ranch JP. 1991 Effect of 2,4-D concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in Soybean (*Glycine max* L. Merr). *In vitro Cell Dev Biol* 27: 121–140.
- Susumu, H, Hiroshi Mnakawa, Koji Takashi, Riyoshi Takashi, Makita Hajika, kyuya Harada, Norihiro Ohtsubo 2007, Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnology* 24, 435–440.
- Youchang, Li and Qu Liang. 1997. A review and prospect on mutation breeding of oil crops in china. *Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia*, RDA, STA, Most and JAIF 12–18 Oct. Suwon Korea