

# Seleksi *In Vitro* Embrio Somatik pada Beberapa Genotipe Kedelai untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan dan Toksisitas Aluminium

Adam Saepudin<sup>1\*</sup>, Nurul Khumaida<sup>2</sup>, Didy Sopandie<sup>2</sup>, Sintho W. Ardie<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi,  
Jl. Siliwangi No. 24 Tasikmalaya 46115

<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

\*E-mail: saepudinadam@yahoo.com

## ABSTRAK

Penggunaan embrio somatik dalam seleksi *in vitro* bermanfaat selama sifat yang terseleksi dapat diturunkan pada generasi berikutnya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media induksi embrio somatik optimum pada lima genotipe kedelai dan varian somaklon yang mempunyai ketahanan terhadap kekeringan dan aluminium melalui seleksi *in vitro* menggunakan polyethylene glycol (PEG) and  $AlCl_3$ . Penelitian menggunakan lima genotipe kedelai yaitu Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4. Hasil penelitian menunjukkan media induksi embrio somatik terbaik adalah 3% sukrosa + NAA 5 mg/l + 2,4-D 5 mg/l + Vit B5 untuk semua genotipe yang dicoba, dan Tanggamus merupakan genotipe yang mampu menghasilkan keempat tahap embrio somatik yang terbentuk (globular, hati, torpedo dan kotiledon) dan dapat diregenerasikan membentuk planlet. Seleksi *in vitro* menggunakan media PEG (0, 5, 10, 15, and 20%) dilakukan pada semua genotipe kedelai. Setelah 3 bulan dalam media seleksi, genotipe SP-10-4 menghasilkan jumlah kalus segar (*surviving callus*) maupun kalus yang embriogenik tertinggi dan tidak berbeda nyata dengan genotipe Tanggamus. Sebaliknya, CG-22-10 menghasilkan jumlah kalus segar dan jumlah kalus embriogenik terendah. Pada percobaan seleksi *in vitro* ini didapatkan tujuh embrio somatik yang berhasil berkecambah dan dapat diregenerasikan membentuk planlet sebagai kandidat somaklon yang toleran kekeringan. Seleksi *in vitro* dilanjutkan dengan menggunakan media  $AlCl_3$  (0, 100, 300, 400 dan 500 mg/l), dan setelah kultur berumur 5 minggu, kandidat somaklon semua genotipe yang toleran kekeringan dan aluminium didapatkan dari kalus embriogenik dan embrio somatik yang selamat (*survived*).

Kata kunci: *Glycine max* (L), embrio somatic, seleksi, kekeringan, toksisitas Al

## ABSTRACT

**In vitro selection of somatic embryos from several soybean genotypes for drought tolerance and aluminium toxicity.** The use of somatic embryo for *in vitro* selection program is very valuable since the selected traits will be inherited in the progenies. This study was aimed to obtain the optimum somatic embryo-induction medium of five soybean genotypes, and somaclone variants with tolerant to drought and aluminium through *in vitro* selection using polyethylene glycol (PEG) and  $AlCl_3$ . Five soybean genotypes (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow Biloxi, CG-22-10, and SP-10-4) were used in this study. Results showed that based on callus diameter and number of embryogenic callus, the best somatic embryo-induction medium was 3% sucrose + NAA 5 mg/l + 2,4-D 5 mg/l + Vit B5 for all the genotypes, and Tanggamus was the genotypes that successfully formed the four steps of somatic embryos (globular, heart, torpedo and cotyledonary stages) and regenerated into plantlet initiation. *In vitro* selection using media containing PEG (0, 5, 10, 15, and 20%) was done to all

genotypes. After 3 months in the selection medium, SP-10-4 genotypes showed the highest number of fresh callus (surviving callus) and number of embryogenic callus, which was not different to Tanggamus genotype. In contrast, CG-22-10 genotypes had the lowest number of fresh callus and number of embryogenic callus compared to other genotypes. There were seven somatic embryos from PEG selection were successfully germinated and regenerated into plantlet initiation as somaclone candidates with drought tolerance. After 5 weeks in selection media of  $AlCl_3$  (0, 100, 300, 400 dan 500 mg/l), somaclone candidates of all genotype with drought and Al tolerance were obtained from the embryogenic callus and somatic embryo survived.

Keywords: *Glycinemax* (L), somatic embryo, selection, drought, Al toxicity.

## PENDAHULUAN

Kedelai merupakan pangan utama setelah padi, khususnya di Indonesia, digunakan sebagai pangan maupun pakan. Kedelai mengandung gizi tinggi, terutama protein nabati. Biji kedelai mengandung 42–45% protein (Bhatnagar dan Tiwari 1996). Produksi nasional kedelai belum mencukupi kebutuhan, sehingga setiap tahun Indonesia mengimpor kedelai. Rata-rata kebutuhan kedelai 2,1 juta ton/tahun, sementara produksi dalam negeri baru mencapai 900 ribu ton, karena itu masih dibutuhkan impor 1,2 juta ton. Pemerintah merencanakan untuk mengurangi impor kedelai hingga 20% per tahun dan meningkatkan produksi dalam negeri 20% per tahun sehingga target swasembada kedelai pada 2014 dapat tercapai (Menteri Pertanian 2010). Menurut Yolinda *dkk.* (2015), Indonesia belum swasembada kedelai karena beberapa faktor yaitu usahatani kedelai diusahakan satu kali setahun, lahan sempit, produktivitas rendah, biaya produksi, keuntungan dan efisiensi usahatani masih rendah.

Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi agar swasembada kedelai dapat tercapai adalah dengan perluasan areal tanam, perbaikan varietas, dan perbaikan teknologi budidaya. Program perluasan areal tanam antara lain dapat dilakukan pada lahan-lahan marginal. Menurut Sopandie (2006), peningkatan produksi kedelai di lahan marginal dapat dicapai melalui: (1) perbaikan potensi hasil dari galur-galur beradaptasi luas, (2) memperbaiki tingkat adaptasi tanaman terhadap cekaman abiotik dan resistensi terhadap cekaman biotik, (3) perbaikan teknik budidaya berbasis fisiologis dan ekofisiologis tanaman. Faktor-faktor tersebut harus sinergis agar peningkatan hasil dapat tercapai.

Pengembangan kedelai di lahan marginal, khususnya pada tanah masam dan bersifat kering atau yang mengalami kekeringan (*drought*), memerlukan kultivar yang toleran terhadap cekaman kekeringan dan atau tanah masam. Kultivar unggul dapat dirakit melalui perbaikan genetik, baik melalui persilangan konvensional maupun dengan pendekatan bioteknologi.

Variasi somaklonal adalah variasi genetik tanaman, yang dihasilkan melalui kultur jaringan atau kultur sel (Larkin dan Scowcroft 1981), yang meliputi semua variasi genetik yang terjadi pada hasil regenerasi dari sel yang tidak terdiferensiasi, protoplas, kalus maupun jaringan. Variasi somaklonal dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik untuk sifat-sifat yang berperan penting dalam pemuliaan tanaman. Jain (2001) menyatakan bahwa kultur *in vitro* dapat menginduksi variasi somaklonal. Penggunaan seleksi *in vitro* pada tingkat sel dan jaringan menggunakan agen penyeleksi diharapkan dapat diperoleh karakter yang diinginkan.

Salah satu metode yang dapat dikembangkan dalam mendapatkan galur-galur kedelai yang toleran kekeringan dan sekaligus toleran kemasaman tinggi adalah melalui induksi

variasi somaklonal dan seleksi *in vitro* menggunakan agen penyeleksi PEG, yang kemudian diikuti oleh agen penyeleksi  $AlCl_3$ . Penggunaan teknik *in vitro* dengan induksi embrio somatik (ES) diharapkan dapat menghasilkan varian-varian somaklon yang diinginkan dan dapat diregenerasikan. *Poly-ethyleneglycol* (PEG) dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan dengan homogenitas yang lebih tinggi. Begitu pula penggunaan media yang mengandung  $AlCl_3$  pada kultur kalus embriogenik pada kondisi pH 4, diharapkan dapat menyeleksi massa sel-sel embriogenik tanaman kedelai untuk toleran Al.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan: (1) media induksi, proliferasi dan regenerasi embrio somatik pada lima genotipe kedelai, (2) Varian somaklonal yang putatif toleran kekeringan, (3) Varian somaklonal yang putatif toleran kekeringan dan atau cekaman aluminium.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Mikroteknik, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB. Analisis histologi jaringan dilakukan di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2011 sampai Maret 2014.

### Induksi embrio somatik (ES)

Percobaan bertujuan untuk mendapatkan komposisi media induksi ES terbaik pada masing-masing genotipe kedelai. Percobaan faktorial (dua faktor) disusun berdasarkan rancangan acak lengkap, diulang tiga kali. Faktor pertama adalah genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4). Faktor kedua adalah komposisi media induksi kalus embriogenik yang terdiri atas 10 taraf kombinasi sukrosa dan ZPT dengan media dasar MS+2 g/l gelrite+vit B5 (Tabel 1). Satuan percobaan adalah satu botol kultur berisi empat kotiledon muda.

Sumber eksplan berasal dari polong muda (*immature pods*) berumur 14 hari setelah bunga mekar dengan ukuran 4–6 mm. Kotiledon muda tanpa aksis embrio ditanam dengan posisi abaksial, yaitu bagian kotiledon yang cembung menyentuh media tanam. Pengamatan dilakukan pada 5 minggu setelah kultur (MSK) terhadap jumlah kalus embriogenik dan jumlah ES terbentuk.

### Optimasi media induksi ES

Tujuan percobaan ini adalah untuk mendapatkan komposisi media induksi terbaik berdasarkan hasil dari percobaan 1a. Pada kelima genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4). Eksplan berupa kotiledon muda dari polong muda (*immature pod*) yang berumur 14 hari setelah bunga mekar dengan ukuran 4–6 mm. Kotiledon muda tanpa aksis embrio ditanam dengan posisi abaksial. Percobaan faktorial (dua faktor) disusun berdasarkan rancangan acak lengkap, diulang 10 kali. Faktor pertama adalah genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10 dan SP-10-4). Faktor kedua adalah komposisi media induksi ES yang terdiri atas 5 taraf yaitu media MS+2 g/l gelrite+30 g/l sukrosa+Vit B5 dengan penambahan ZPT (I7, I8 dan I9). Satuan percobaan adalah satu botol kultur berisi dua kotiledon muda. Pengamatan dilaku-

kan pada 5 minggu setelah kultur (MSK), terhadap jumlah ES yang terbentuk, jumlah ES beregenerasi, dan histologi menggunakan metode parafin pada berbagai fase ES.

Tabel 1. Komposisi media induksi kalus embriogenik

Kode	Komposisi
I1.	6 % Suk + 2,4-D 40 mg/l + Gly 2 mg/l + Arg 100 mg/l + Glu 100 mg/l
I2.	6 % Suk + 2,4-D 20 mg/l + Gly 1 mg/l + Arg 50 mg/l + Glu 50 mg/l
I3.	3 % Suk + 2,4-D 40 mg/l + Gly 2 mg/l + Arg 100 mg/l + Glu 100 mg/l
I4.	3 % Suk + 2,4-D 20 mg/l + Gly 1 mg/l + Arg 50 mg/l + Glu 50 mg/l
I5.	3 % Suk + NAA 5 mg/l
I6.	3 % Suk + NAA 5 mg/l + Arg 100 mg/l + Glu 100 mg/l
I7.	3 % Suk + 2,4-D 10 mg/l + NAA 10 mg/l
I8.	3 % Suk + 2,4-D 5 mg/l + NAA 5 mg/l
I9.	3 % Suk + 2,4-D 40 mg/l
I10.	3 % Suk + 2,4-D 20 mg/l

Keterangan : Suk = sukrosa; Gly = glycine; Arg = arginine; Glu = glutamine; NAA = naphthalene acetic acid; 2,4-D = 2,4-dichloropbenoxy acetic acid.

## Percobaan 2. Optimasi media proliferasi ES

Tujuan percobaan ini adalah untuk mendapatkan komposisi media proliferasi ES terbaik pada lima genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, CG-22-10 dan SP-10-4). Sumber eksplan yang digunakan berasal dari ES kedelai hasil Percobaan 1a dan 1b. Percobaan faktorial (dua faktor) disusun berdasarkan rancangan acak lengkap, diulang 7 kali. Faktor pertama yaitu komposisi media asal yang terdiri atas 6 taraf, yaitu media MS + 2 g/l gelrite + 30 g/l sukrosa + Vit B5 dengan penambahan ZPT atau kombinasinya dengan asam amino (I4, I5, I6, I7, I8, dan I10). Faktor kedua adalah komposisi media proliferasi ES yang terdiri atas 5 taraf yaitu media MS + 2 g/l gelrite + 30 g/l sukrosa + Vit B5 dengan penambahan ZPT atau kombinasinya dengan asam amino (I4, I5, I6, I8, dan I10). Satuan percobaan adalah satu botol kultur berisi empat *clump* kalus. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kalus embriogenik dan jumlah ES yang terbentuk pada 5 minggu setelah proliferasi (MSP).

## Percobaan 3. Seleksi *in vitro* kalus embriogenik kedelai terhadap cekaman kekeringan

Tujuan percobaan ini adalah untuk mendapatkan varian somaklonal kedelai yang putatif toleran kekeringan. Bahan tanam yang digunakan adalah kalus embriogenik yang dihasilkan pada percobaan 1b. Kalus embriogenik disubkultur ke dalam media seleksi yang mengandung PEG dan dikulturkan selama tiga bulan pada ruang kultur dengan suhu  $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , tingkat penyinaran 1.500 lux dan fotoperiode 24 jam. Seleksi dilakukan pada tahap kalus embriogenik. Percobaan faktorial (dua faktor) disusun berdasarkan rancangan acak lengkap, diulang 10 kali. Faktor pertama adalah genotipe kedelai (Tanggamus, Yellow biloxi, CG-22-10, dan SP-10-4). Faktor kedua adalah konsentrasi PEG 6.000 dengan kesetaraan nilai potensial osmotik menurut Michel dan Kaufmann (1975), yaitu PEG 0% (0,00 MPa), PEG 5% (-0,13 MPa), PEG 10% (-0,19 MPa), PEG 15% (-0,41 MPa), dan PEG 20% (-0,67 MPa). Masing-masing konsentrasi PEG ditambahkan ke

dalam media MS+30 g/l sukrosa+5 ppm 2,4-D+5 ppm NAA sebagai media seleksi. Satuan percobaan adalah satu botol kultur berisi empat *clump* kalus. Setelah seleksi selama tiga bulan, pengamatan dilakukan terhadap persentase kalus segar (*survive*), jumlah kalus embriogenik, dan jumlah ES hidup yang beregenerasi.

#### **Percobaan 4. Seleksi *in vitro* kalus embriogenik kedelai terhadap cekaman kekeringan dan atau tanah masam**

Percobaan bertujuan untuk mendapatkan varian somaklonal kedelai yang putatif toleran cekaman kekeringan dan atau toksisitas Al. Eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang dihasilkan pada Percobaan 1b. Kalus selanjutnya disubkultur pada media seleksi dan dikulturkan selama satu bulan. Percobaan faktorial (dua faktor) disusun berdasarkan rancangan acak lengkap, diulang 10 kali. Faktor pertama adalah konsentrasi PEG 6.000 pada media asal yaitu: PEG 0% (0,00 MPa), PEG 5% (-0,13 MPa), PEG 10% (-0,19 MPa), PEG 15% (-0,41 MPa) dan PEG 20% (-0,67 MPa). Faktor kedua adalah konsentrasi  $AlCl_3$  (0, 50, 100, 200 dan 400 mg/l). Media seleksi *in vitro* adalah media dasar MS modifikasi + sukrosa 30 g/l + 2,4-D 5 mg/l + NAA 5 mg/l+vit B5. Media MS modifikasi yaitu dengan menggunakan  $NH_4NO_3$  2.4 mg/l,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  15 mg/l,  $KH_2PO_4$  13 mg/l, dan  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  28 mg/l yang tidak dikelat oleh EDTA, bertujuan untuk memunculkan toksisitas Al. Media yang mengandung  $AlCl_3$  memiliki pH 4,0 dan gelrite 4 g/l digunakan sebagai pematat. Media kontrol (media tanpa penambahan  $AlCl_3$ ) memiliki pH 5,8. Satuan percobaan adalah satu botol kultur berisi dua *clump* kalus pada tiap genotipe (Tanggungamus, Yellow biloxi, CG-22-10 dan SP-10-4). Pengamatan dilakukan terhadap diameter kalus dan persentase kalus segar (*survive*) pada lima minggu setelah kultur (MSK).

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Induksi ES Genotipe Kedelai**

Pada semua genotipe yang diuji, kalus mulai terbentuk pada eksplan kotiledon muda saat berumur 4 minggu setelah tanam (MST), pembentukan kalus makin bertambah setelah 5 MST, termasuk kalus-kalus yang embriogenik, yaitu kalus yang memiliki struktur kompak dan ditemukan warna kalus yang putih kekuningan. Warna kalus yang putih kekuningan dengan struktur yang kompak mengindikasikan adanya kapasitas embriogenik dari massa kalus tersebut (Tang *et al.* 2000; Fulzele dan Satdive 2003, Kumari *et al.* 2006).

Induksi kalus embriogenik dipengaruhi oleh genotipe (Texeira *et al.* 2011; Yang *et al.* 2009; Parrott *et al.* 1989) maupun media induksi yang digunakan (Lazzeri *et al.* 1987; Hofmann *et al.* 2004). Tabel 2 menunjukkan terdapat interaksi antara genotipe dan media induksi terhadap jumlah kalus embriogenik yang dihasilkan. Jumlah kalus embriogenik tertinggi (26,3) didapatkan pada genotipe Anjasmoro yang dikulturkan pada media induksi 3% Suc+2,4-D 5 mg/l+NAA 5 mg/l.

Media yang mengandung sukrosa dengan konsentrasi tinggi (6%) dan asam amino menghasilkan jumlah kalus embriogenik yang lebih rendah pada semua genotipe. Hal ini mengindikasikan sukrosa dengan konsentrasi tinggi dan asam amino bukan merupakan faktor induktif untuk pembentukan embrio somatik atau jaringan yang embriogenik.

Peningkatan konsentrasi sukrosa dan asam amino khususnya glutamin digunakan lebih ke arah pematangan atau perkembangan embrio (Gray 2005).

Tabel 2. Pengaruh media induksi dan genotipe terhadap jumlah klump kalus embriogenik per botol.

Media	Genotipe				
	Tanggamus	Anjasmoro	Yellow biloxi	CG-22-10	SP-10-4
6% suk+2,4-D40 mg/l+asam amino1	0,00 be	0,00 bc	0,00 bd	0,00 bc	2,67 aab
6% suk+2,4-D20 mg/l+asam amino2	0,00 ae	1,67 ac	0,67 ad	2,00 ac	3,67 aab
3% suk+2,4-D40 mg/l+asam amino1	0,00 be	0,67 bc	0,00 bd	0,00 bc	8,33 aab
3% suk+2,4-D20 mg/l+asam amino2	8,33 aabc	13,67 aabc	20,67 aa	6,33 abc	14,33 aab
3% suk+NAA5mg/l	12,00 aa	14,67 aabc	1,00 acd	6,33 abc	15,00 aab
3% suk+NAA5mg/l+asam amino3	10,67 aab	20,00 aab	5,00 abcd	14,00 aab	18,33 aab
3% suk+2,4-D10mg/l+NAA10mg/l	4,33 bcde	6,33 bbc	6,33 bbcd	7,00 bbc	19,33 aa
3% suk+2,4-D5 mg/l +NAA5mg/l	5,67 bcd	26,33 aa	13,33 bab	15,33 ba	5,00 bab
3% suk+2,4-D40mg/l	1,67 bde	13,00 aabc	1,00 bcd	0,67 bc	2,33 bb
3% suk+2,4-D20mg/l	7,00 abc	9,33 abc	10,00 abc	3,00 ac	18,00 aab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil sama pada baris yang sama dan angka yang diikuti huruf besar yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $\alpha = 0,05$ ). Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g/l dan mengandung vitamin B5. Suk = sukrosa; Asam amino1 = glisin 2 mg/l + arginin 100 mg/l + glutamin 100 mg/l; Asam amino2 = glisin 1 mg/l + arginin 50 mg/l + glutamin 50 mg/l; Asam amino3 = arginin 100 mg/l + glutamin 100 mg/l.

Tabel 3 menunjukkan jumlah embrio somatik kelima genotipe kedelai yang dihasilkan pada media induksi 3% sukrosa + 2,4-D 10 mg/l + NAA 10 mg/l pada 12 MSP. Dari kelima genotipe yang diuji pada media induksi tersebut hanya Yellow biloxi yang menghasilkan embrio somatik hingga fase kotiledon (terdiri atas 1 bentuk globular, 3 torpedo dan 3 kotiledon). Genotipe Tanggamus, Anjasmoro dan CG-22-10 hanya menghasilkan masing-masing 1 globular dan SP 10-4 menghasilkan 4 globular. Pembentukan tahap-tahap embrio yang dihasilkan tersebut bergantung pada genotipe yang digunakan. Parrott *et al.* (1989) menyatakan bahwa genotipe sangat berpengaruh dalam keberhasilan embriogenesis somatik. Selain genotipe, konsentrasi auksin juga mempengaruhi terbentuknya fase-fase embrio somatik. Hasil percobaan ini menunjukkan konsentrasi NAA yang tidak terlalu tinggi (10 mg/l) sudah mampu menginduksi embrio somatik pada berbagai tahapan (globular, torpedo, dan kotiledon). Diduga NAA juga berperan dalam proses maturasi. NAA merupakan auksin sintetik yang memiliki aktivitas fisiologi sangat kuat, persistensi yang lama, dan mudah ditranslokasikan (Wattimena 1992).

Tabel 3. Jumlah embrio somatik lima genotipe kedelai pada media induksi I7 (3% sukrosa + 2,4-D 10 mg/l + NAA 10 mg/l) pada 12 MSP

Genotipe	Jumlah embrio somatik			
	Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	1	0	0	0
Anjasmoro	1	0	0	0
Yellow biloxi	1	0	3	3
CG-22-10	2	0	0	0
SP-10-4	4	0	0	0

### Optimasi media induksi ES genotipe kedelai

Jumlah embrio somatik yang dihasilkan pada percobaan induksi embrio somatik (Percobaan 1a) masih sangat sedikit dan hanya genotipe Yellow biloxi yang menghasilkan



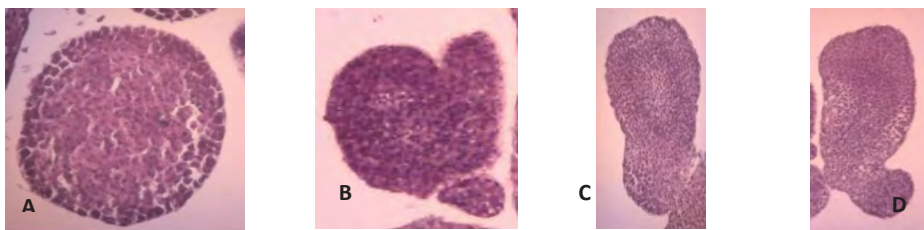
ketiga tahap embrio somatik (1 globular, 3 torpedo, dan 3 kotiledon). Oleh karena itu diperlukan percobaan optimasi media induksi ES untuk meningkatkan keberhasilan induksi ES dari eksplan kotiledon muda pada kelima genotipe yang diuji. Media 3% Suc + 2,4-D 5mg/l + NAA 5 mg/l merupakan media induksi terbaik yang dicirikan oleh jumlah ES (fase globular) yang lebih banyak (Tabel 4). Aplikasi 2,4-D untuk induksi embriogenesis seringkali dikombinasikan dengan auksin lainnya, antara lain NAA seperti yang dilakukan Lazzeri *et al.* (1987).

Tabel 4 menunjukkan genotipe Tanggamus memberikan jumlah ES (fase globular) lebih banyak dibanding genotipe lainnya, kecuali SP-10-4. Berdasarkan fase embrio yang terbentuk, genotipe Tanggamus juga menghasilkan keempat tahap embrio somatik (globular, hati, torpedo, dan kotiledon), yang kemudian disusul oleh genotipe Yellow biloxi (Gambar 1). Terbentuknya fase-fase ES pada genotipe Tanggamus diperlihatkan pula oleh hasil analisis histologi. Perbedaan jumlah kalus embriogenik dan fase-fase embrio yang terbentuk antargenotipe diduga lebih disebabkan oleh faktor genotipe (*genotype specific*) sehingga respons masing-masing genotipe pada tiap media memberikan hasil yang berbeda.

Tabel 4. Jumlah ES lima genotipe kedelai pada media induksi I7, I8 dan I9 pada 6 MST

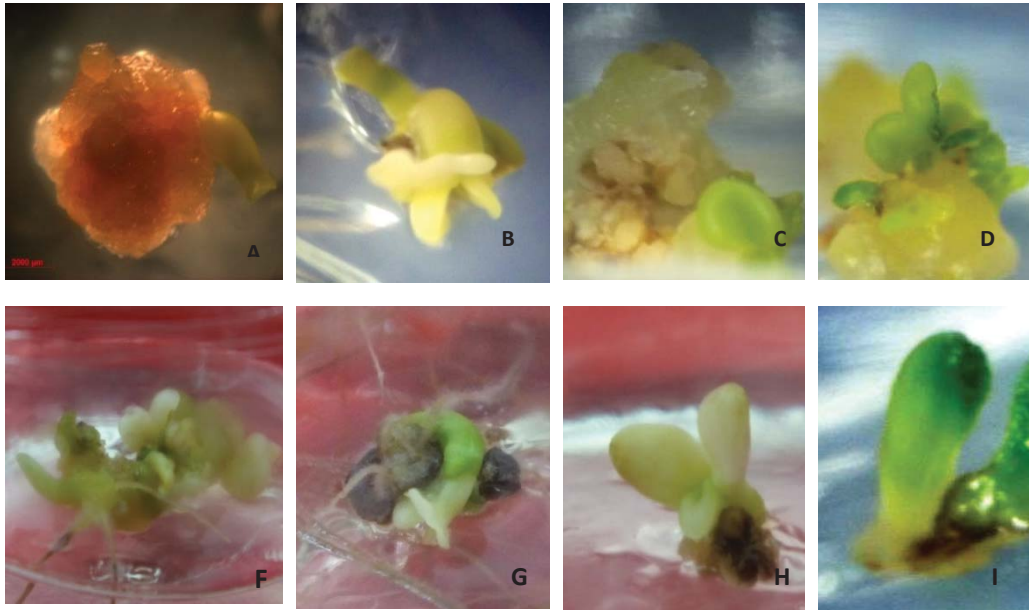
Genotipe	Media induksi	Jml eksplan yg diinokulasi	Jumlah embrio somatik			
			Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	I7	30	16	0	2	3
	I8	30	29	0	3	0
	I9	30	24	2	5	3
Anjasmoro	I7	30	11	0	0	0
	I8	30	16	0	0	0
	I9	30	0	0	0	0
Yellow biloxi	I7	30	28	0	3	3
	I8	30	29	0	0	0
	I9	30	3	1	0	0
CG-22-10	I7	30	15	0	0	0
	I8	30	23	0	0	0
	I9	30	11	0	0	0
SP-10-4	I7	30	28	0	0	0
	I8	30	23	0	0	0
	I9	30	7	0	0	0

Keterangan : I7= 3 % Suk + 2,4-D 10 mg/l + NAA 10 mg/l; I8=3 % Suk + 2,4-D 5 mg/l + NAA 5 mg/l; I9=3 % Suk + 2,4-D 40 mg/l. Seluruh media menggunakan media dasar MS, gelrite 2 g/l dan mengandung vitamin B5.



Gambar 1. Tahapan embriogenesis somatik pada genotipe Yellow biloxi (A Fase globular, B Fase hati, C Fase

torpedo dan D Fase kotiledon).



Gambar 2. Regenerasi ES genotipe Tanggamus pada media MS0 (A, B, C dan D) dan sesudah disubkultur dari media MS0 ke media MS+2ppm GA3+4ppmBAP (E, F, G dan H).

Hasil regenerasi (*plant conversion*) semua embrio somatic (globular, hati, torpedo, dan kotiledon) pada percobaan 1 dan 2 menggunakan media MS0 (*free hormon*) dan media MS + sukrosa 10g/l + GA3 2mg/l + BAP4mg/l + VitB5 didapatkan ES genotipe Tanggamus yang berhasil berkecambah hingga membentuk struktur seperti tunas (inisiasi plantlet) (Gambar 2), yaitu 7 ES dari media induksi 3% Suc + 2,4-D10mg/l + NAA10 mg/l dan 8 ES dari media induksi 3%Suc + 2,4-D40mg/l.

### Proliferasi ES genotipe kedelai

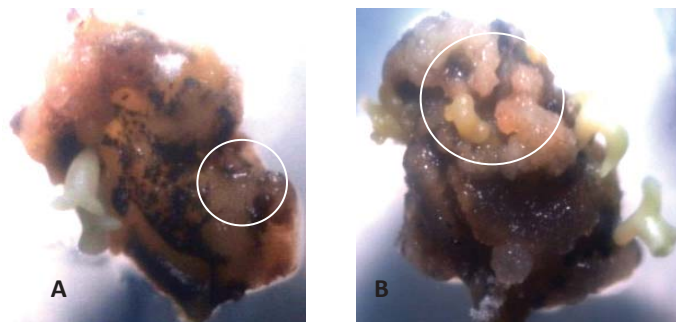
Pada media proliferasi, eksplan kalus hasil percobaan induksi (Percobaan 1a) mengalami proliferasi, yang diindikasikan oleh peningkatan jumlah kalus embriogenik maupun jumlah embrio globular yang dihasilkan pada setiap genotipe yang diuji, seperti tercantum pada Gambar 3 untuk genotipe Tanggamus. Media proliferasi 3% sukrosa + 2,4-D 5 mg/l + NAA 5 mg/l memberikan jumlah kalus embriogenik lebih banyak pada semua genotipe. Tabel 5 menunjukkan genotipe Yellow biloxi memberikan jumlah ES hasil proliferasi lebih banyak dibanding genotipe lainnya.

Media proliferasi yang digunakan pada percobaan ini merupakan lima media induksi terbaik berdasarkan diameter dan jumlah kalus embriogenik yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan von Arnold *et al.* (2002), bahwa kalus embriogenik biasanya dipelihara dan mengalami proliferasi pada medium yang sama dengan yang digunakan pada media inisiasi, seperti yang digunakan pada kultur cair untuk propagasi skala besar.



Tabel 5. Jumlah ES lima genotipe kedelai setelah disubkultur dari media induksi I4 ke media proliferasi I8 pada 8 MSP.

Genotipe	Jumlah globular awal	Jumlah ES terbentuk setelah proliferasi			
		Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	1	7	0	0	0
Anjasmoro	1	4	0	1	3
Yellow biloxi	2	9	0	0	0
CG-22-10	1	4	0	0	0
SP-10-4	2	6	0	0	0



Gambar 3. Proliferasi ES pada genotipe Tanggamus. ES globular dan torpedo sebelum proliferasi (A), ES globular bertambah disertai terbentuknya kotiledon setelah proliferasi (B)

### Seleksi *in vitro* kalus embriogenik kedelai terhadap cekaman kekeringan

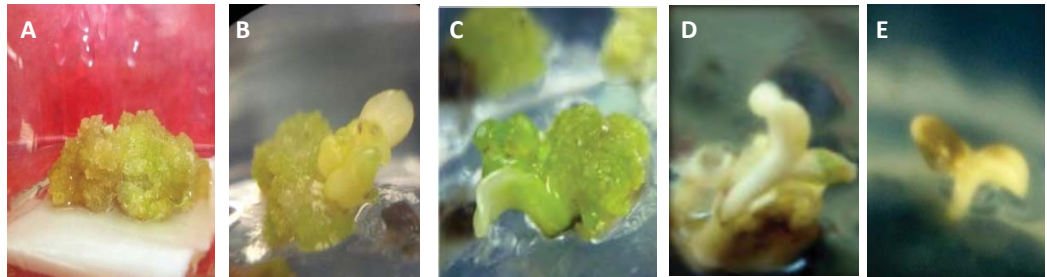
Genotipe SP-10-4 menunjukkan jumlah kalus segar (*surviving callus*) tertinggi dan tidak berbeda dengan genotipe Tanggamus (Tabel 6). Sebaliknya, genotipe CG-22-10 menghasilkan jumlah kalus segar terendah dibanding genotipe lainnya. Perlakuan konsentrasi PEG yang lebih tinggi menyebabkan penurunan jumlah kalus segar dan jumlah kalus embriogenik pada semua genotipe yang diuji.

Kalus embriogenik dan embrio somatik yang selamat (*survive*) dari hasil seleksi dengan PEG kemudian dikecambahkan atau diregenerasikan pada media dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0). ES yang masih bertahan/hidup pada media seleksi ini selain terdapat pada kalus-kalus segar juga ditemukan pada kalus-kalus yang mengalami pencokelatan (*browning*). Pada percobaan ini, didapatkan 7 ES hasil seleksi yang berhasil berkecambah dan beregenerasi membentuk inisiasi plantlet yaitu 2 ES dari media PEG 5%, 3ES dari media 10%, dan 2 ES dari media PEG 15%. Terdapatnya regenerasi ES membentuk inisiasi plantlet ini dicirikan oleh terbentuknya calon tunas (*leafy shoot*) dengan atau tanpa pemunculan akar (Gambar 4). Dengan demikian, ketujuh calon plantlet genotipe Tanggamus merupakan kandidat varian somaklonal yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Pada ES yang mengalami gejala pencokelatan disebabkan oleh pemberian PEG pada media terutama, pada konsentrasi lebih tinggi. Penambahan PEG ke dalam media MS menurunkan potensial air media dan mendorong terjadinya cekaman air yang berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan kalus dan kemampuan kultivar kedelai untuk beregenerasi *in vitro* (Sakthivelu *et al.* 2008).

Tabel 6. Pengaruh genotipe terhadap jumlah klum kalus segar (%) pada media seleksi

Genotipe	Jumlah klum kalus segar (%)		
	4 MSK	8MSK	12 MSK
SP-10-4	87,12 a	84,68 a	83,96 a
Tanggamus	81,68 b	79,78 a	80,26 a
Yellow Biloxi	63,50 c	62,34 b	62,38 b
CG-22-10	61,60 c	59,26 b	58,74 b

Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $\alpha = 0,05$ ).



Gambar4. Seleksi kalus embriogenik genotipe Tanggamus pada media PEG (A) dan regenerasinya pada media MS0 + 1g/l arang aktif (B, C, D dan E).

### Seleksi *in vitro* kalus embriogenik kedelai terhadap cekaman kekeringan dan atau tanah masam

Eksplan yang ditanam pada media seleksi adalah kalus-kalus *survive* setelah diseleksi dengan PEG pada percobaan 2. Hasil uji F dan uji Duncan menunjukkan interaksi antara media seleksi PEG dan media seleksi Al hanya terdapat pada diameter kalus, yaitu pada genotipe Tanggamus dan Yellow biloxi. Dengan demikian, diameter dan jumlah kalus segar cenderung sama untuk keempat genotipe yang dicobakan atau diduga genotipe CG-22-10 dan SP-10-4 toleran terhadap cekaman Al seperti yang dimiliki genotipe Tanggamus dan Yellow biloxi yang merupakan genotipe toleran Al.

Baik pada media seleksi PEG maupun pada media seleksi Al digunakan ZPT 2,4-D 5 ppm dan NAA 5 ppm. Sebelumnya Gesteira *et al.* (2002) dalam penelitian embriogenesis kedelai melaporkan bahwa penggunaan ZPT 2,4-D pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan variasi somaklonal. Pada percobaan ini didapatkan kalus embriogenik dan embrio somatik hasil seleksi PEG dan  $AlCl_3$  untuk tiap genotipe (Tabel 7) sehingga merupakan kandidat varian somaklonal yang toleran cekaman kekeringan maupun aluminium (putatif toleran ganda). Pada seleksi ganda ini hanya genotipe Tanggamus yang menghasilkan embrio somatik hingga fase hati.

Tabel 7. Jumlah embrio somatik hasil seleksi ganda PEG dan Al pada 5 MSK

Genotipe	Jumlah ES hasil seleksi ganda PEG dan Al			
	Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon
Tanggamus	10	3	0	0
Yellow biloxi	8	0	0	0
CG-22-10	5	0	0	0
SP-10-4	10	0	0	0

## KESIMPULAN

Media induksi dan media proliferasi ES terbaik untuk kelima genotipe kedelai (Tanggamus, Anjasmoro, Yellow biloxi, SP-10-4 dan CG-22-10) adalah MS + 5 ppm 2,4-D + 5 ppm NAA. Genotipe Tanggamuspada media MS + 2,4-D 40 ppm dan media MS + 10 ppm 2,4-D + 10 ppm NAA berhasil membentuk kecambah dan beregenerasi membentuk plantlet.

Pada genotipe Tanggamus berhasil didapatkan 7 regeneran kandidat varian somaklonal yang toleran kekeringan (putatif). Keempat genotipe kedelai (Tanggamus, Yellow biloxi, SP-10-4, dan CG-22-10) pada seleksi menggunakan PEG dan  $AlCl_3$  menghasilkan kandidat varian somaklonal berupa kalus embriogenik dan ES yang toleran kekeringan maupun aluminium (putatif).

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhatnagar PS, SP Tiwari. 1996. Soybean. Genetics and Breeding of Crops Plants, Vol.1. Pulse and Oil Seed. *Science publisher*. Inc USA.
- Fulzele DV, Satdive RK. 2003. Somatic embryogenesis, plant regeneration, and the evaluation of camptothecin content in *Nothapodytes foetida*. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 39:212–216.
- Gray DJ. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue: Nonzygotic embryogenesis. *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press Boca Raton London. p: 9–15.
- Hofmann N, Nelson RL dan Korban SS. 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 157–163.
- Jain SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–156.
- Kumari BDR, Settu A, Sujatha G. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration. *Indian J Biotechnol*. 5:243–345.
- Larkin P J, WR Scowcroft. 1981. Somaklonal variation-novel source of variability from cell cultures. *Theor. and Appl. Genet.* 60: 197–214.
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB. 1987. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10, 197–208.
- Menteri Pertanian. 2010. Pemerintah Targetkan Swasembada Kedelai 2014. <http://www.antaranews.com/berita/1267594881/pemerintah-targetkan-swasembada-kedelai-2014>. [3 Maret 2010].
- Parrott WA, Williams EG, Hildebrand DF, Collins GB. 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tiss Organ Cul*. 16:15–21.
- Sakthivelu, G., M.K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G.A. Ravishankar, T. Nedev, G.

- Kustorkova, 2008. Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiology, Special Issue*, 34 (1–2), 103–112.
- Sopandie D. 2006. Perspektif Fisiologi Dalam Pengembangan Tanaman Pangan Di Lahan Marginal. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Fisiologi Tanaman. Fakultas Pertanian. IPB. 16 Sept. 2006.
- Tang K, E. Zhao, Q Hu, J Yao, A Wu. 2000. A simple and efficient procedure to improve plant regeneration from protoplast isolated from long-term cell-suspension cultures of indica rice. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 36:361–365.
- Texeira LR, Braccini AL, Churata BGM, Vieira ESN, Martins PK, Schuster I. 2011. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. *Maringà*. 33(1):67–74.
- Wattimena GA. 1992. *Bioteknologi Tanaman I*. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas Bioteknologi.
- Yang, C., T. Zhao, D. Yu, J. Gai. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]—impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 45:180–188.
- Yolinda E, Rachmina D dan Feryanto. 2015. Kajian Usahatani Kedelai: Mengapa Swasembada Kedelai Tidak Tercapai. Prosiding-Seminar Nasional Agribisnis Kedelai: Antara Swasembada dan Kesejahteraan Petani. Magister Manajemen Agribisnis UGM Yogyakarta.