

**PENGARUH KONSENTRASI NAA DALAM MENGINDUKSI
EMBRIO SOMATIK BEBERAPA VARIETAS KEDELAI
SERTA REGENERASINYA SECARA *In vitro* ^{*)}**

Oleh : Gustian ^{)}**

Abstract

This experiment studied somatic embryogenesis of five soybean varieties (wilis, Kerinci, Dempo, singgalang, and Krakatau) and their regeneration to form plantlets *In vitro* by using immature cotyledons explant which was conducted at Plant Tissue Culture Laboratory, MAPENI, Indarung, Padang from April to October 2003. The experiment used four NAA concentrations (8, 10, 12, and 12 mg/l media) which were added to MSO. Treatments were arranged in factorial Completely Randomized Design (5x4) with 2 factors and 10 replications. Somatic Embryos (SEs) were yielded from this testing which would be regenerated on MSO and charcoal. The result of this experiment indicated that NAA responded by all soybean varieties in forming SEs. The SEs which was yielded from all varieties that tested can be regenerated and become plantlets. It can be concluded that all soybean varieties responsive to NAA. The best NAA concentrations for SEs induction is 10 – 14 mg/l media and they are can be regenerated to form plantlets.

Key word : soybean, NAA, *In vitro*, Somatic embryogenesis, plantlet

^{*)} Funded by Regular Funding Andalas University 2003

^{**)} Lecturer at Faculty of Agriculture, Andalas University

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Regenerasi tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui induksi tunas (organogenesis) atau induksi embrio somatik (embriogenesis somatik). Teknik kultur jaringan yang dapat menginduksi embrio somatik (ES) lebih diinginkan karena berasal dari satu embrio bipolar dari jaringan somatik yang perkembangannya serupa dengan embrio normal tanpa hubungan vascular dengan jaringan asalnya (Bhojwani dan Razdan, 1983). Oleh karena itu kultur jaringan dengan teknik induksi ES pada kedelai mempunyai prospek yang dapat dimanfaatkan dalam aplikasi rekayasa genetika jika gen target yang bermanfaat sudah dimiliki karena efektif untuk menghasilkan tanaman transgenik.

Tiga faktor utama yang berpengaruh dalam induksi ES adalah genotipe, tipe eksplan dan media induksi ES. Dalam media ES, penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) sangat berpengaruh dalam induksi ES (Pierik, 1987). Disamping itu, jenis dan konsentrasi ZPT sangat menentukan keberhasilan induksi ES yang dilakukan (Murashige, 1973).

Pengaruh genotipe dalam induksi ES pada kedelai telah banyak dilaporkan peneliti. Komatsuda dan Ohayama (1993) berhasil menginduksi ES dari 26 genotipe kedelai, akan tetapi efektifitas metode yang dikembangkan untuk menginduksi ES sangat bervariasi. Orczyk dan Orczyk, (1984) melaporkan keberhasilan induksi ES dan meregenerasikannya menjadi planlet dari sejumlah genotipe kedelai. Hasil penelitian mereka juga menunjukkan adanya genotipe kedelai yang sulit menginduksi ES secara *in vitro*. Peranan genotipe dalam induksi ES dan regenerasi planlet pada kultur suspensi juga telah dilaporkan (Bayley *et al.*, (1993); Jin *et al.*, (1996)).

ES dapat diinduksi dengan menggunakan eksplan yang berasal dari jaringan yang masih muda (George dan Sherrington, 1984). Eksplan yang berasal dari kotiledon muda telah terbukti dapat menginduksi ES kedelai (Li *et al.*, 1985; Lippmann dan Lippmann, 1983; Shomaker *et al.*, 1991). Sedangkan eksplan yang berasal dari jaringan lain tidak dapat menginduksi ES Chang *et al.*, (1980)

melaporkan bahwa eksplan yang berasal dari hypokotil kecambah kedelai hanya dapat diregenerasikan melalui organogenesis.

Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mempelajari pengaruh genotipe kedelai dalam induksi embrio somatik
2. Mencari komposisi media yang tepat untuk masing-masing varietas yang diuji dalam induksi embrio somatik
3. Mencari komposisi media yang tepat untuk perkecambahan dan regenerasinya menjadi planlet.

Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan informasi tentang pemecahan masalah kultur jaringan pada tanaman kedelai. Mengingat regenerasi *in vitro* merupakan langkah penting dalam transformasi genetik dan metode transformasi merupakan salah satu komponen kunci dalam aplikasi teknik rekayasa genetika, maka regenerasi dengan teknik kultur jaringan merupakan syarat yang sangat penting dalam keberhasilan untuk mendapatkan kultivar unggul melalui teknik rekayasa genetika.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Percobaan telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Lembaga Swadaya Masyarakat, Masyarakat Peduli Petani (MAPENI), Indarrung Padang dari bulan Mei sampai Oktober 2003.

Rancangan

Rancangan lingkungan yang digunakan adalah Faktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama adalah varietas kedelai yang terdiri dari lima taraf yaitu : (1) Wilis, (2) Kerinci, (3) Singgalang, (4) Dempo, dan (5) Krakatau. Sedangkan faktor kedua terdiri dari empat taraf konsentrasi NAA yaitu : (1) 8 mg/l media, (2) 10 mg/l media, (3) 12 mg/l media, dan 14 mg/l media.

Sehingga pada percobaan ini terdapat 20 kombinasi percobaan. Masing-masing perlakuan untuk setiap pengujian dibuat ulangan 10 kali (10 botol kultur). Masing-masing botol kultur ditanam 12 eksplan, sehingga secara keseluruhan digunakan 2400 eksplan.

Penyiapan dan Sterilisasi Media

Media yang digunakan untuk induksi embrio somatik adalah MSO, yang terdiri dari garam-garam MS (Murashige dan Skoog), vitamin B5, sukrosa dengan konsentrasi 15 gr/liter media, agar bacto 8 gr/liter media, serta suplemen berupa asam amino yaitu L-Glutamine (30 mg/liter media), Asparagine (30 mg/liter media), Glycine (10 mg/liter media), dan Casein Hydrolysat (1 gr/liter media). Penambahan ZPT disesuaikan dengan konsentrasi perlakuan untuk masing-masing pengujian. Media diatur pH nya menjadi 5.8 dengan menggunakan 0.1 N NaOH dan 0.1 N HCl. Setelah itu agar dimasukkan ke dalam media, lalu dimasak dengan kompor gas sambil terus diaduk hingga mendidih. Media yang telah masak dituang ke dalam botol-botol kultur sebanyak 20 ml/botol. Botol-botol yang telah diisi media ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 17.5 psi selama 30 menit.

Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Sebelum penanaman, bahan berupa polong muda terlebih dulu disterilkan dengan cara merendam dalam larutan kloroks 20%, lalu dikocok selama 20 menit dan selanjutnya dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya kotiledon muda (berukuran 3 – 5 mm) diisolasi dari polong dengan menggunakan scapel dan pinset steril, kemudian kedua sumbunya dibuang. Setiap keping kotiledon ditanam pada posisi *abaxial* pada media yang sesuai dengan perlakuan untuk masing-masing pengujian. Botol kultur yang telah berisi 12 eksplan diletakkan pada rak kultur yang disinari lampu TL dengan intensitas 1000 lux selama 24 jam dengan suhu ruang sekitar 25^o C.

Perkecambahan ES dan Regenerasi Planlet

Agar dapat berkecambah, ES yang telah terbentuk di subkultur ke dalam media MSO + Charcoal (1 gr/liter media) untuk semua varietas yang diuji. Caranya adalah setiap ES yang terbentuk dipisahkan dari eksplan (pemisahan dilakukan dengan hati-hati agar embrio tidak patah). ES yang telah terpisah dari eksplan dikultur pada MSO + Charcoal dengan menempatkan sepuluh ES pada setiap botol kultur untuk setiap varietas yang dicobakan. Masing-masing varietas dibuat ulangan sepuluh kali.

ES yang berkecambah di subkultur pada media regenerasi sebanyak lima kecambah dengan sepuluh ulangan. Dengan demikian terdapat 50 kecambah untuk setiap varietas yang diuji. Subkultur dilakukan tiga minggu sekali sampai terbentuknya planlet.

Peubah yang diamati adalah : (1) persentase terbentuknya ES, (2) jumlah ES per eksplan, (3) persentase ES yang berkecambah, dan (4) persentase terbentuknya planlet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase eksplan yang menghasilkan embrio

Penggunaan ZPT jenis NAA telah terbukti dapat menginduksi ES tanaman kedelai. Dari empat taraf konsentrasi NAA yang dicobakan pada lima varietas kedelai, ternyata semua varietas memperlihatkan respon positif yang ditunjukkan dengan munculnya ES untuk semua level konsentrasi NAA yang diperlakukan. Namun demikian masing-masing varietas yang dicobakan menunjukkan respon yang bervariasi untuk setiap level konsentrasi NAA (Tabel 1).

Dalam media induksi ES mulai terlihat empat minggu setelah penanaman, kemudia membesar setelah kultur berumur enam minggu. ES muncul secara langsung pada bahagian pinggir mengelilingi eksplan. ini menunjukkan bahwa ES yang muncul tidak berasal dari kalus embriogenik, tetapi langsung dari sel-sel asal dari kotiledon. ES yang muncul pada mulanya berbentuk bulat (globular) berwarna hijau, kemudian setelah dua minggu ES tersebut berkembang menjadi bentuk torpedo.

Pada Tabel I terlihat bahwa persentase eksplan yang menghasilkan ES untuk varietas wilis terdapat pada konsentrasi NAA 10 mg/liter media (68.7 %) dan yang terendah pada konsentrasi 8 mg/liter media (42.5%). Sedangkan pada varietas kerinci persentase eksplan yang menghasilkan ES tertinggi terjadi pada konsentrasi NAA 14 mg/liter media (77.5 %) dan terendah pada konsentrasi 8 mg/l media (42.5 %). Pada varietas dempo, persentase eksplan yang menghasilkan ES tertinggi terjadi pada konsentrasi 10 mg/liter media (73.6%) dan yang terendah pada konsentrasi 8 mg/liter media (55.8 %). Sedangkan pada varietas singgalang persentase eksplan yang menghasilkan ES terjadi pada konsentrasi NAA 14 mg/liter media (71.6 %), yang terendah pada konsentrasi 8 mg/liter media (53.3 %). Untuk varietas Krakatau, persentase eksplan yang menghasilkan ES terdapat pada konsentrasi NAA 10 mg/liter media (78.8 %), dan terendah pada 14 mg/liter media (37.0 %).

Tabel I. Persentase eksplan yang menghasilkan ES akibat perlakuan beberapa konsentrasi NAA pada lima varietas kedelai.

Varietas	Konsentrasi NAA (mg/l media)			
	0.8	10	12	14
Wilis	42.5 ± 13.8	68.7 ± 13.9	62.5 ± 9.9	45.1 ± 10.7
Kerinci	42.5 ± 9.9	64.8 ± 11.4	69.0 ± 8.1	77.5 ± 12.4
Dempo	55.8 ± 9.6	73.6 ± 15.2	63.3 ± 14.1	57.5 ± 10.7
Singgalang	53.3 ± 13.1	58.3 ± 11.7	60.0 ± 17.9	71.6 ± 14.8
Krakatau	60.0 ± 18.7	78.8 ± 7.9	53.3 ± 11.9	37.0 ± 10.6

Secara umum semua varietas yang dicobakan memiliki respon yang tinggi untuk semua level konsentrasi NAA yang diuji dalam induksi ES, akan tetapi masing-masing varietas cenderung memperlihatkan respon yang berbeda untuk setiap level konsentrasi NAA. Perbedaan tersebut memberi gambaran bahwa masing-masing varietas yang diuji memiliki karakter genotipe yang bervariasi. Variasi genotipe tersebut kemungkinan akan mempengaruhi kandungan hormon endogen sehingga respon terhadap konsentrasi tertentu dari NAA akan bervariasi pula dalam induksi embrio somatik. Alasan ini dilandasi oleh pendapat Bhojwani dan Razdan (1983); George dan Sherington (1984); bahwa kemampuan regenerasi

in vitro suatu tanaman sangat ditentukan oleh komposisi media, jenis eksplan. Selain itu, variasi genotipe dalam satu jenis tanaman (spesies) akan sangat mungkin menimbulkan respon yang berbeda dalam regenerasi *in vitro* (Pierik, 1987). Diperkuat oleh hasil penelitian Bailey, Boerma, dan Parrot (1993) bahwa kemampuan dari 8 galur kedelai yang mereka uji dengan perlakuan 2-4D sangat bervariasi dalam menghasilkan ES. Variasi tersebut berkisar antara 46 – 94%.

Jumlah ES per Eksplan

Pengamatan terhadap jumlah ES per eksplan akibat perlakuan beberapa konsentrasi NAA terhadap masing-masing varietas yang diuji dapat dilihat pada Tabel 2. Pada Tabel 2 terlihat bahwa penambahan konsentrasi NAA yang berbeda memberikan pengaruh yang hampir sama dalam menghasilkan jumlah ES per eksplan pada masing-masing varietas.

Untuk varietas wilis, rata-rata jumlah ES per eksplan terbanyak terjadi pada level NAA 10 mg/liter media (3.2), dan yang paling sedikit pada konsentrasi NAA 14 mg/liter (2.5). Pada varietas kerinci, rata-rata jumlah ES per eksplan terbanyak juga pada konsentrasi NAA 10 mg/liter media (3.4) dan terendah pada konsentrasi NAA 8 mg/liter media. Sedangkan pada varietas dempo, rata-rata jumlah ES per eksplan terbanyak terjadi pada konsentrasi NAA 14 mg/liter media (3.8) dan yang terendah pada NAA 8 mg/liter media (2.7). Pada varietas singalang, rata-rata jumlah ES per eksplan terbanyak berada pada level NAA 10 mg/liter media (3.0) dan yang terendah pada 14 mg/liter media (2.6). Pada varietas krakatau, rata-rata jumlah ES per eksplan terbanyak terjadi pada level NAA 10 mg/liter media (4.4) dan yang terendah terjadi pada konsentrasi 14 mg/liter media (3.4).

Perbedaan respon antar varietas ini sangat mungkin disebabkan oleh adanya variasi genotipe, variasi tersebut berpotensi untuk menghasilkan hormon endogen yang berbeda pula. Dengan perbedaan tersebut, diduga sel-sel yang berkompeten untuk membentuk ES akan terpengaruh.

Tabel 2. Rata-rata jumlah ES per eksplan akibat perlakuan beberapa konsentrasi NAA pada lima varietas kedelai.

Varietas	Konsentrasi NAA (mg/l media)			
	8	10	12	14
Wilis	2.8 ±0.6	3.2 ±0.8	2.6 ±0.4	2.4 ±0.6
Kerinci	2.8 ±0.5	3.4 ±0.5	3.3 ±0.4	2.9 ±0.4
Dempo	2.7 ±0.5	3.1 ±0.7	3.5 ±0.5	3.8 ±0.2
Singgalang	2.9 ±0.5	3.0 ±0.5	2.8 ±0.5	2.6 ±0.5
Krakatau	4.1 ±0.7	4.4 ±0.7	3.9 ±0.9	2.5 ±0.5

Persentase ES Yang Berkecambah

Pengamatan terhadap ES yang dapat berkecambah untuk masing-masing varietas yang dicobakan dapat dilihat pada Tabel 3. Dari data terlihat bahwa persentase ES yang berkecambah terjadi pada semua varietas yang diuji, namun terdapat perbedaan diantara masing-masing varietas. Persentase kecambah yang tertinggi terjadi pada varietas kerinci (41%), sedangkan yang terendah pada varietas dempo (21%). Rendahnya persentase kecambah pada dempo disebabkan karena sebahagian besar ES hanya mampu membesar dan memanjang tanpa adanya inisiasi kuncup daun. ES yang berkembang seperti ini tidak akan mampu membentuk planlet, walaupun kultur dipertahankan dalam jangka waktu yang panjang.

Persentase Terbentuknya Planlet

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3. Data yang dimunculkan terlihat bahwa persentase planlet yang terbentuk dari semua varietas yang diuji tidak memperlihatkan perbedaan yang berarti. Sangat kecilnya variasi tersebut menunjukkan bahwa untuk berkembangnya kecambah menjadi planlet tidak dipengaruhi oleh variasi genotipe. Dengan demikian kecambah yang berkembang hanya ditentukan oleh kondisi kultur yang dalam pengujian ini diatur sedemikian rupa sehingga seragam.

Tabel 3. Persentase perkecambahan embrio, persentase terbentuknya planlet pada lima varietas kedelai.

Varietas	Pengamatan	
	Kecambah (%)	Planlet (%)
Wilis	39	96
Kerinci	41	98
Dempo	23	94
Singgalang	38	92
Krakatau	40	98

KESIMPULAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Kultur jaringan kedelai dapat dipecahkan dengan metode baku melalui induksi ES.
2. ZPT jenis NAA dapat menginduksi ES semua varietas kedelai yang dicobakan.
3. Konsentrasi NAA terbaik untuk menginduksi ES berkisar antara 10-14 mg/liter media.
4. ES yang terjadi dapat diregenerasikan menjadi planlet untuk semua varietas yang diuji.

Saran

Dalam aplikasi teknik kultur jaringan pada kedelai melalui induksi ES dapat digunakan eksplan kotiledon muda yang dikultur pada media MS yang dimodifikasi dengan menggunakan vitamin B5 dan suplemen. Konsentrasi NAA yang digunakan berkisar antara 10-14 mg/l media.

DAFTAR PUSTAKA

- Armini, N.M., G.A. Wattimena, dan L.W. Gunawan. 1992. Perbanyak tanaman secara *in vitro*. PAU Bioteknologi, IPB.
- Bailey, M.A., H.R. Boerma, and W.A. Parrot. 1993. Genotype effect on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In vitro Cell Report*. 24: 102 – 108.
- Bhojwani, S.S., and M.K. Razdan. 1983. Plant tissue culture; theory and practice. Else vier, New York.
- Cheng, T.Y., H. Asaka, and T.H.V. Dinh. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters*. 19 : 91 – 99.
- George, E.F., and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture : Exegetics Ltd. England.
- Gonsalves, D. and J.L. Slington. 1993. Coat protein mediated protection analysis of transgenic plants for resistance in variety of crop. *Sem. Virol*. 4: 397-406.
- Jin, H., G.L. Hartman, Y.H. Huang, C.D. Nickell, and J.M. Widholm. 1996. Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of fusarium solani and screening of regenerants for resistance. *Phyto- pathology J*. 86 : 714 – 718.
- Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, and T. Fujimura. 1992. Mechanism of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol*. 28 : 11 – 14.
- Komatsuda, T., and K. Okayama. 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor Appl Genet*. 75 : 695 – 7001.
- Komatsuda, T., W. Lee, dan S. Oka. 1992. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybean *Glycine gracilis Skvort* and *Glycine max (L.) Merr*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 28 : 113 – 113.
- Orczyk, A.N. and W. Orczyk. 1994. New aspects of soybean somatic embryogenesis. *Euphytica* 80 : 137 – 143.
- Trijatmiko, K.R. dan J. Harjosudarmo. 1996. Regenerasi tanaman kedelai melalui embrio somatik. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 1 : 53 – 59.