

## Induksi dan Proliferasi Kalus Embriogenik pada Beberapa Genotipe Kedelai

### *Embryogenic Callus Induction and Proliferation on Several Soybean Genotypes*

Nurul Khumaida<sup>1\*</sup> dan Tri Handayani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 1 Oktober 2009/Disetujui 4 Januari 2010

#### ABSTRACT

The successfull of gene transformation on crop plants depends on the ability of explant to develop somatic embryos. The effect of medium composition on induction and proliferation of embryonic callus was analyzed on several soybean genotypes, including low irradiance (LI) tolerant genotype (Ceneng, Pangrango C6-30-10 dan C6-76-10) and two LI sensitive genotypes (Godeg and Slamet). Immature cotyledons (14 DAA) were cultured in induction medium including MSIA (MS, vitamin B5, 30% sucrose, 0.2% gelrite, 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 10 mg L<sup>-1</sup> NAA) and MSIB (MS, vitamin B5, 30% sucrose, 0.2% gelrite, and 40 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D). Embryonic calli was subcultured one month after initiation onto proliferation medium including MSIIA (MS, vit. B5, 30% sucrose, 0.2% gelrite, 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 5 mg L<sup>-1</sup> NAA) and MSIIB (MS, vitamin B5, 30% sucrose, 0.2% gelrite, and 20 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D). The result showed that percentage of callused explant was 76-94% and the highest initiation obtained on Pangrango genotypes. The average of calli diameter at 1 month after initiation was 0.5-1.2 cm. Calli which was obtained on MSIA medium showed yellow, tranparent, and friable, whereas calli was obtained on MSIB medium showed yellow-brown, transparent, and friable. Increasing calli diameter and structure were obtained on proliferation medium. The combination of 2,4-D and NAA on MSIA and MSIIA both are induction and proliferation medium respectively were better than MSIB and MSIIB which were contain only 2,4-D. Ceneng genotype showed best performance of somatic embryogenesis than others, and Slamet genotype showed lowest response both on callus induction and proliferaion.

Keywords: immature cotyledons, embryonic callus, NAA, 2,4-D

#### PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) merupakan salah satu tanaman pangan penting di Indonesia sebagai salah satu sumber protein nabati. Berdasarkan data BPS (2005) pada periode tahun 2000-2004 Indonesia mengimpor kedelai mencapai rata-rata 1.20 juta ton per tahun. Tingginya kebutuhan kedelai tersebut mendorong perlu dilakukannya peningkatan produksi kedelai di Indonesia. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu dengan memanfaatkan lahan di bawah tegakan tanaman perkebunan, kehutanan (HTI/agroforestri), dan ditumpangsarikan dengan tanaman lainnya. Kendala dari pemanfaatan lahan tersebut adalah rendahnya intensitas cahaya akibat naungan sehingga tanaman tidak mampu tumbuh, berkembang dan berproduksi dengan baik (Sopandie *et al.*, 2006).

Upaya perbaikan tanaman kedelai terhadap kondisi naungan telah dilakukan oleh tim peneliti kedelai Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor melalui kajian fisiologi, molekuler dan pemuliaan tanaman secara konvensional. Perakitan varietas baru kedelai tahan naungan ini ditujukan untuk mensukseskan

program revitalisasi pertanian dimana pada tahun 2010 ditargetkan produksi kedelai mampu mencukupi 60% kebutuhan nasional dan pada tahun 2015 Indonesia telah 100% swasembada kedelai.

Perakitan varietas kedelai unggul yang toleran naungan dengan produktivitas tinggi dapat dilakukan melalui pemuliaan konvensional dan rekayasa genetika. Hiraga *et al.* (2007) menyatakan bahwa kedelai merupakan salah satu komoditas paling populer sebagai target perbaikan mutu secara bioteknologi. Akan tetapi penelitian secara biologi molekuler terhadap kedelai terkendala oleh kesesuaian genotipe untuk transformasinya.

Perakitan varietas baru kedelai juga banyak dilakukan dengan memanfaatkan teknologi transformasi genetik. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis telah banyak digunakan untuk menghasilkan tanaman transgenik dengan memanfaatkan *Agrobacterium tumefaciens* maupun dengan teknik penembakan partikel genetik (Santarem *et al.*, 1997).

Proses perakitan kedelai transgenik mensyaratkan keberhasilan proses regenerasi. Kedelai dapat diregenerasikan melalui dua proses yang berbeda, yaitu melalui organogenesis (*shoot morphogenesis*) dan embriogenesis somatik. Morfogenesis tunas/organogenesis merupakan proses pembentukan dan perkembangan tunas dari jaringan meristem tunas. Tunas selanjutnya dapat

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail : nkhumaida@yahoo.com

diakarkan menjadi tanaman utuh (Barwale *et al.*, 1986). Santos *et al.* (2006) mendefinisikan embriogenesis sebagai proses perkembangan sel somatik menjadi tanaman lengkap melalui karakteristik stadia pembentukan embrio tanpa melalui peleburan sel gamet. Regenerasi kedelai melalui embriogenesis terjadi apabila eksplan diinduksi pada media yang mengandung auksin dengan konsentrasi sedang sampai tinggi.

Parrott *et al.* (1988) melaporkan auksin yang banyak digunakan untuk induksi embrio somatik adalah 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 5-40 mg L<sup>-1</sup> atau  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.8-10 mg L<sup>-1</sup>. Parrott *et al.* (1989) melaporkan bahwa kemampuan eksplan kotiledon muda untuk membentuk embrio somatik dipengaruhi oleh genotipe kedelai.

Hasil penelitian mutakhir menunjukkan bahwa embrio somatik kedelai dapat diinduksi secara efisien dari kotiledon muda (*immature cotyledon*) yang ditumbuhkan pada medium yang ditambah dengan konsentrasi tinggi (sampai dengan 40 ppm), kemudian diproliferasikan dalam media cair atau pada media padat yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi lebih rendah, setelah itu didiferensiasikan menjadi embrio fase kotiledon tanpa penambahan auksin eksogen. Protokol tersebut telah diaplikasikan pada kultivar-kultivar kedelai asal Amerika Utara seperti 'Jack', 'Williams' dan 'Fayette' (Hiraga *et al.*, 2007). Selanjutnya Kita *et al.* (2006) menyebutkan bahwa genotipe kedelai yang mempunyai kemampuan untuk membentuk embrio somatik primer dan membentuk embrio somatik sekunder (proliferasi) serta mampu kembali menjadi tanaman yang lengkap merupakan genotipe yang potensial untuk ditransformasi. Dengan demikian pengembangan protokol baku diperlukan untuk meregenerasikan beberapa genotipe kedelai secara embriogenesis somatik.

Penelitian ini mempelajari potensi embriogenesis dari enam genotipe kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respon enam genotipe kedelai pada media induksi dan media proliferasi kalus embriogenik.

## BAHAN DAN METODE

Benih enam genotipe tanaman kedelai yang meliputi Ceneng, Pangrango, CG-30-10, CG-76-10 (toleran naungan) dan Godek, dan Slamet (peka naungan) ditanam dalam pot yang berisi media tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 (v/v). Polong muda berumur kurang lebih 14 hari setelah anthesis (HSA) dipanen, selanjutnya disterilisasi sebelum kotiledon mudanya digunakan sebagai sumber eksplan.

Media perlakuan untuk induksi kalus embriogenik yaitu media MSIA terdiri dari media dasar MS (Murashige dan Skoog) yang ditambah vitamin B5 (Gamborg), sukrosa 3%, gelrite 0.2% untuk pematid, 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D dan 10 mg L<sup>-1</sup> NAA. Media MSIB terdiri dari media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, dan 40 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. Media proliferasi kalus embriogenik meliputi media MSIIA (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, dan 5 mg L<sup>-1</sup> NAA) dan media MSIIB (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, dan 20

mg L<sup>-1</sup> 2,4-D) dengan pH media masing-masing perlakuan sebesar 5.8.

Eksplan berupa kotiledon muda dengan ukuran  $\pm$  5 mm, yang berwarna hijau mengkilap dari polong muda (umur 14 hari setelah anthesis) tanaman kedelai. Polong muda disterilisasi dengan menggunakan alkohol 96%. Polong direndam dalam larutan alkohol 96% selama  $\pm$  10 menit, kemudian direndam dalam larutan alkohol 96% yang baru selama  $\pm$  5 menit. Kotiledon muda diambil dan dibuang kulit arinya. Selanjutnya kotiledon dipotong pada bagian ujung dan pangkalnya. Kotiledon dikulturkan dengan posisi abaksial pada media induksi kalus embriogenik dan ditumbuhkan pada ruang kultur pada suhu 25  $\pm$  3 °C dengan lama pencahayaan selama 24 jam. Eksplan dikulturkan pada media induksi selama 4 minggu.

Kalus embriogenik yang berasal dari media MSIA dan MSIB, dengan bobot 10-20 mg disubkulturkan ke dalam media proliferasi kalus embriogenik (media MSIIA dan MSIIB). Kultur ditumbuhkan pada ruang kultur dengan suhu 25  $\pm$  3 °C dan pencahayaan selama 24 jam pada intensitas cahaya 1500-2000 lux.

## Metode Penelitian

Penelitian terdiri atas dua tahap yaitu 1) Induksi kalus embriogenik pada media MSIA dan MSIB; 2) Proliferasi kalus embriogenik pada media MSIIA dan MSIIB. Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor pertama adalah genotipe kedelai (Ceneng, Pangrango, C6-30-10, C6-76-10, Godeg, dan Slamet) dan faktor ke-dua adalah media induksi (MSIA dan MSIB) atau media proliferasi (MSIIA dan MSIIB). Percobaan terdiri dari 12 kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak 6 kali dan setiap ulangan terdiri dari 3 botol kultur, sehingga jumlah satuan pengamatan masing-masing 18 botol.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Suatu jaringan tanaman dapat diregenerasikan secara *in vitro* melalui dua cara yaitu organogenesis/morfogenesis tunas dan embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan proses dimana sel somatik dalam kondisi terinduksi akan menghasilkan sel-sel embriogenik, yang akan mengalami serangkaian perubahan morfologi dan biokimia dan akhirnya terbentuk embrio somatik (Zimmerman, 1993; Jimenez, 2001). Semua sel somatik di dalam tanaman mengandung seri informasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan tanaman utuh dan fungsional, sehingga embriogenesis somatik merupakan bentuk dasar dari sifat totipotensi (*total genetic potential*) sel, suatu sifat unik dari tanaman tingkat tinggi (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

## Induksi Kalus Embriogenik

Eksplan kotiledon muda mulai berkalus pada umur 1-2 minggu setelah kultur (MSK). Persentase eksplan berkalus lebih dari 75%, baik pada media MSIA maupun

media MSIB (Tabel 1). Selama 4 minggu kultur pada media induksi, persentase eksplan berkalus tertinggi diperoleh genotipe Pangrango (93.94%) dan terendah 75.7% pada genotipe Slamet. Parrots *et al.* (1989) menyatakan bahwa genotipe dengan persentase eksplan berkalus yang tinggi, pada pertumbuhannya akan cenderung membentuk embrio somatik yang lebih banyak.

Respon pertumbuhan kalus pada media induksi disajikan pada Tabel 2. Pada 4 MSK genotipe Ceneng dan CG-30-10 mempunyai rata-rata diameter kalus tertinggi. Genotipe Slamet yang mempunyai persentase eksplan berkalus terendah juga menunjukkan ukuran diameter yang terendah. Rata-rata diameter kalus kultur pada media MSIA menunjukkan hasil yang lebih besar (0.92 cm) dibandingkan dengan media MSIB (0.78 cm).

Pertumbuhan kalus embriogenik tergantung pada genotipe dan komposisi media yang digunakan (Tabel 3).

Tabel 1. Persentase eksplan berkalus pada media induksi

Genotipe	Eksplan berkalus (%)	
	MSIA	MSIB
Pangrango	93.9	80.0
Ceneng	92.1	91.7
CG-30-10	83.3	87.5
CG-76-10	80.0	77.8
Godek	85.7	83.3
Slamet	77.3	75.7

Keterangan: MSIA (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 30%, gelrite 0.2%, 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D dan 10 mg L<sup>-1</sup> NAA)  
MSIB (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 30%, gelrite 0.2%, dan 40 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D)

Tabel 2. Diameter kalus embriogenik pada beberapa genotipe kedelai pada umur 4 MSK

Perlakuan	Diameter (cm)
Genotipe	
Pangrango	0.82 bc
Ceneng	0.94 a
Godeg	0.78dc
Slamet	0.68 d
CG-30-10	0.95 a
CG-76-10	0.92ab
Media	
MSIA	0.92 a
MSIB	0.78 b

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata menurut uji Duncan pada taraf 5%

Hasil tersebut senada dengan penelitian Hofmann *et al.* (2004), yang menunjukkan bahwa frekuensi embriogenesis secara nyata dipengaruhi oleh genotipe, kandungan sukrosa dan jenis auksin yang digunakan.

Dalam induksi embrio somatik hormon 2,4-D cenderung menginduksi embrio somatik secara tidak langsung melalui fase kalus sehingga jumlah embrio yang dihasilkan cukup banyak. Namun embrio yang dihasilkan banyak yang abnormal dan sulit dikecambahkan menjadi planlet. NAA cenderung menginduksi embrio secara langsung tanpa pembentukan kalus. Embrio yang dihasilkan relatif normal dan mudah dikecambahkan, tetapi jumlahnya sedikit (Pardal *et al.*, 2004).

Media induksi menunjukkan penampakan kalus yang hampir sama dengan kalus pada media MSIB. Kalus yang terbentuk pada media MSIA berwarna kuning dengan tekstur kalus lunak, remah, tampak struktur globular, dan transparan, sedangkan pada media MSIB kalus berwarna kuning kecoklatan, lunak, remah dan tampak struktur globular. Meskipun mempunyai penampakan kalus yang hampir sama namun ukuran kalus dan jumlah struktur globular yang terlihat pada media MSIA lebih banyak dibandingkan media MSIB (Tabel 3).

Struktur seperti globular yang tampak pada kalus menunjukkan kemungkinan jaringan membentuk embrio somatik. Terdapat empat fase diferensiasi jaringan embrio somatik menjadi planlet tanaman dalam perkembangan embrio somatik yaitu fase globular, fase bentuk hati, fase torpedo dan fase kotiledon. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa fase embrio somatik pada media induksi MSIA dan MSIB adalah fase globular.

Tabel 3. Keragaan kalus beberapa genotipe kedelai pada 4 MSK

Genotipe	Media	Warna	Tekstur	Jumlah struktur globular
Pangrango	MSIA	5Y9/6	RT	+++
	MSIB	7.5Y9/2	RT	+
Ceneng	MSIA	5Y9/6	RT	+++
	MSIB	7.5Y9/2	RT	++
Godeg	MSIA	5Y9/6	RT	+++
	MSIB	1Y7.5/6	RB	+
Slamet	MSIA	5Y9/6	RB	+
	MSIB	7.5Y9/6	RT	+
CG-30-10	MSIA	7.5Y9/2	RT	+++
	MSIB	2.5Y8.5/6	RT	++
CG-76-10	MSIA	7.5Y9/2	RT	++
	MSIB	1Y7.5/6	RB	+

Keterangan: R : remah/friabel, T : transparan, B : buram, + : sedikit, ++ : sedang, +++ : banyak

*Proliferasi Kalus Embriogenik*

Proliferasi embrio pada kalus embriogenik terjadi pada sel-sel permukaan atau apikal dari embrio somatik primer (embrio yang pertama kali muncul) (Finer, 1988). Pada proses proliferasi, satu sel atau sekelompok kecil sel di permukaan embrio primer akan membentuk embrio somatik baru (embrio sekunder) (Pardal, 2002). Hasil percobaan menunjukkan bahwa pada media MSIIA dan MSIIIB terjadi proliferasi kalus embriogenik yang salah satunya ditandai dengan semakin bertambahnya massa kalus akibat penambahan embrio yang baru. Pertambahan massa kalus terlihat dengan ukuran diameter kalus yang semakin besar (Tabel 4).

Tahap proliferasi subkultur pertama (SK-1) memperlihatkan pertambahan diameter kalus genotipe Ceneng, Slamet, dan CG-76-10 menunjukkan respon yang tidak berbeda nyata antara media MSIIA dan MSIIIB, sedangkan pada genotipe Pangrango, Godeg, dan CG-30-10 media MSIIA memberikan respon yang lebih baik. Proliferasi SK-2 genotipe Pangrango yang dikulturkan pada media MSIIA menunjukkan pertambahan diameter yang paling besar dibandingkan genotipe lainnya (Tabel 4), sedangkan media MSIIIB memberikan pertambahan diameter yang rendah pada hampir semua genotipe. Terjadinya penurunan diameter kalus pada genotipe Slamet diduga karena beberapa kultur kalus gagal untuk berproliferasi pada media MSIIA. Tomlin *et al.* (2002) melaporkan bahwa

Tabel 4. Pengaruh genotipe dan media proliferasi pada pertambahan diameter kalus selama subkultur ke-1 (SK-1) dan subkultur ke-2 (SK-2)

Genotipe	Perlakuan		Pertambahan diameter (cm)	
	Media	SK 1	SK2	
Pangrango	MSIIA	0.90 a	1.43 a	
	MSIIIB	0.72 b	0.98 d	
Ceneng	MSIIA	0.78 ab	1.18 bc	
	MSIIIB	0.85 ab	0.76 e	
Godeg	MSIIA	0.93 a	1.20 bc	
	MSIIIB	0.70 b	0.88 de	
Slamet	MSIIA	0.69 b	1.00 dc	
	MSIIIB	0.69 b	0.82 de	
CG-30-10	MSIIA	0.90 a	1.19 bc	
	MSIIIB	0.67 b	0.89 de	
CG-76-10	MSIIA	0.80 ab	1.27 ab	
	MSIIIB	0.72 b	0.74 e	

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata menurut uji DMRT pada taraf 5%. Pertambahan diameter didapatkan dari pengurangan diameter kalus pada 4 MSK – 1 MSK. Data merupakan hasil transformasi dengan rumus  $\sqrt{x} + 0.5$

beberapa genotipe kedelai mengalami penurunan jumlah embrio setelah dipindah ke media proliferasi.

Berdasarkan peubah bobot kalus (Tabel 5) diketahui pada 4 MSK bobot kalus genotipe Pangrango paling besar dibandingkan genotipe lainnya. Bobot kalus terendah didapatkan pada kalus yang dikulturkan pada media MSIIIB. Tahap proliferasi memperlihatkan bahwa genotipe dan komposisi media berpengaruh terhadap respon pertumbuhan kalus. Media proliferasi MSIIA memberikan hasil yang lebih baik pada pertumbuhan kalus embriogenik. Kombinasi 2,4-D dan NAA pada media menyebabkan pertumbuhan kalus embriogenik lebih cepat. Pertumbuhan kalus yang cepat diduga akan mampu menginisiasi embrio somatik lebih banyak.

Bonacin *et al.* (2000) dalam penelitiannya telah mengkombinasikan 5 kultivar kedelai (Renascenca, IAS-5, IAC-17, BR-16, dan FT-Cometa) dengan 3 taraf NAA (8,10 dan 12 mg L<sup>-1</sup>), pH yang berbeda (5.8 dan 7) dan intensitas cahaya rendah (8-12  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) dan tinggi (27-33  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang sangat nyata antara kultivar, taraf NAA dan pH dalam membentuk embrio somatik. Demikian juga antara kultivar, taraf NAA dan intensitas cahaya. Selanjutnya Radhakrishnan dan Ranjithakumari (2007) melaporkan bahwa tingkat proliferasi kalus kedelai kultivar CO3 tertinggi diperoleh pada media B5 yang ditambah dengan 13.3  $\mu\text{M}$  BAP dan 13.5  $\mu\text{M}$  2,4-D, sedangkan induksi tunas diperoleh setelah kalus ditumbuhkan selama 6 minggu pada media yang mengandung 13.3  $\mu\text{M}$  BAP.

Genotipe Slamet pada media proliferasi juga menunjukkan respon yang terendah dibandingkan genotipe lainnya. Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Hiraga *et al.* (2007), bahwa kultivar dengan frekuensi

Tabel 5. Keragaan bobot kalus beberapa genotipe kedelai pada media proliferasi selama SK-2

Genotipe	Perlakuan		Bobot Kalus (g)
	Media		
Pangrango	MSIIA		3.69 a
	MSIIIB		0.07 e
Ceneng	MSIIA		3.0 b
	MSIIIB		0.53 e
CG-30-10	MSIIA		1.74 d
	MSIIIB		0.11 e
CG-76-10	MSIIA		1.70 d
	MSIIIB		0.13 e
Godeg	MSIIA		2.36 c
	MSIIIB		0.45 e
Slamet	MSIIA		0.54 e
	MSIIIB		0.12 e

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata menurut uji DMRT pada taraf 5%.

induksi embrio somatik yang tinggi juga menunjukkan rata-rata jumlah embrio somatik yang tinggi per eksplan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perbedaan efisiensi induksi embrio somatik terjadi karena pengaruh genotipe.

Hasil pengamatan warna dan tekstur kalus pada media proliferasi disajikan pada Tabel 6. Secara umum, pada media proliferasi kalus mulai berwarna kecoklatan akibat *browning*. Tahap proliferasi memperlihatkan kecenderungan warna kalus pada media MSIIIB menunjukkan kecoklatan. Sebagian besar kalus pada media MSIIA masih mempertahankan warna kuning mendekati putih dengan struktur remah dan tekstur yang kasar. Kalus dengan struktur globular berwarna hijau sangat sedikit ditemukan. Kalus dengan struktur globular yang berwarna hijau dengan tekstur halus mempunyai potensi yang besar untuk beregenerasi menjadi planlet tanaman. Hazel *et al.* (1998) menyebutkan bahwa pada saat subkultur, pemilihan jaringan kalus dengan struktur globular yang berwarna hijau dengan tekstur halus berpotensi untuk diregenerasikan menjadi tanaman.

Menurut Santos *et al.* (2006) embriogenesis dapat terjadi melalui beberapa jalur ontogeni. Embrio somatik biasanya akan muncul pertama kali pada permukaan kotiledon pada 4 minggu setelah kultur. Meningkatnya waktu kultur, menyebabkan embrio globular sekunder akan muncul pada permukaan embrio lama. Perkembangan fase embrio akan optimum jika kultur dipindahkan ke media maturasi atau media pendewasaan, dimana akan terjadi perubahan embrio somatik menjadi planlet.

Penurunan konsentrasi auksin pada media proliferasi ditujukan untuk meningkatkan jumlah embrio globular dan meningkatkan jumlah embrio yang berdeferensiasi. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa media MSIIA dengan konsentrasi 5 mg L<sup>-1</sup> NAA dan 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D menyebabkan

respon yang lebih baik terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik. Pada media proliferasi MSIIA, diferensiasi kalus embriogenik mulai terlihat dengan terbentuknya akar dan embrio fase kotiledon (data tidak disajikan), namun demikian jumlah embrio somatik yang berdiferensiasi tidak terlalu besar. Hanya 1-2 kultur yang menunjukkan adanya perubahan struktur kalus embriogenik dalam satu perlakuan. Rendahnya kalus yang berdiferensiasi diduga akibat kurangnya nitrogen organik pada medium. Fu *et al.* (1997) menyatakan bahwa perkembangan embrio kedelai yang rendah dapat ditingkatkan dengan penambahan nitrogen organik seperti glutamin, asparagin dan kasein hidrolisat pada medium kultur. Hal ini dikarenakan kotiledon muda membutuhkan nitrogen organik yang tinggi selama pertumbuhannya. Penambahan asam amino (glutamin dan asparagin, yang merupakan asam amino yang banyak terdapat pada kedelai) dan kasein hidrolisat pada medium kultur cukup efektif dalam embriogenesis kedelai.

**KESIMPULAN**

Kemampuan induksi dan proliferasi kalus embriogenik dari eksplan kotiledon muda kedelai dipengaruhi oleh genotipe dan jenis auksin yang digunakan. Pada tahap induksi maupun tahap proliferasi kalus embriogenik, media MSIA (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 30%, gelrite 0.2%, 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D dan 10 mg L<sup>-1</sup> NAA) dan MSIIA (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, dan 5 mg L<sup>-1</sup> NAA) memberikan respon yang lebih baik dibandingkan dengan media MSIB (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, dan 40 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D) dan MSIIIB (media dasar MS, vitamin B5, sukrosa 3%, gelrite 0.2%, dan 20 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D). Genotipe Ceneng menunjukkan respon induksi dan proliferasi kalus embriogenik terbaik. Genotipe Slamet mempunyai respon terendah baik pada tahap induksi maupun tahap proliferasi kalus embriogenik.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penelitian ini dibiayai dari Hibah Insentif Kementerian Negara Riset dan Teknologi (KMNRT) tahun 2007-2009.

**DAFTAR PUSTAKA**

Badan Pusat Statistik [BPS]. 2005. Statistik Indonesia. Jakarta.

Barwale, U.B., H.R. Kerns, J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473-481.

Bonacin, G.A., A.O.D. Mauro, R.C. de Oliveira, D. Perecin. 2000. Induction of somatic embryogenesis in soybean: Physicochemical factors influencing the

Tabel 6. Keragaan kalus beberapa genotipe kedelai pada Media Proliferasi MSIIA dan MSIIIB

Genotipe	Media	Warna	Tekstur	Jumlah struktur globular
Pangrango	MSIIA	7.5Y 9/6	RT	+++
	MSIIIB	5Y 9/2	RT	+
Ceneng	MSIIA	5Y 9/2	RT	+++
	MSIIIB	5Y 7/4	RT	++
Godeg	MSIIA	2.5Y 9/2	RT	+++
	MSIIIB	2.5Y 7.5/6	RB	++
Slamet	MSIIA	5Y 9/2	RB	+
	MSIIIB	7.5Y 9/6	RT	+
CG-30-10	MSIIA	2.5Y 7.5/6	RT	+++
	MSIIIB	2.5Y 6.5/6	RT	++
CG-76-10	MSIIA	5Y 9/2	RT	++
	MSIIIB	2.5Y 6.5/6	RB	+

Keterangan : R : remah/friabel, T : transparan, B : buram, + : sedikit, ++ : sedang, +++ : banyak

- development of somatic embryos. Genet. Mol. Biol. 23:865-868.
- Finer, J.J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Rep. 7: 238-241.
- Fu, Y., C. Nicolodi, L. Santini, L. Spano, D. Mariotti. 1997. Development and germination of somatic embryos from immature soybean cotyledons: role of auxin-like compounds and organic nitrogen. J. Genet. Breed. 51:341-345.
- Hazel, C.B., T.M. Klein, M. Anis, H.D. Wilde, W.A. Parrott. 1998. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. Plant Cell Rep. 17: 765-772.
- Hiraga, S.H., K. Minakawa, R. Takahashi, M. Takahashi, K. Hajika, Harada, N. Ohtsuba. 2007. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. Plant Biotech. 24:435-440.
- Hofmann, N., R.L. Nelson, S.S. Korban. 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77:157-163.
- Jiménez, V.M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. R. Bras. Fisiol. Veg. 13:196-223
- Kita, Y., K. Nishizawa, M. Takahashi, M. Ishimoto. 2006. Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. Plant Cell Rep. 26:439-440.
- Pardal, S.J. 2002. Perkembangan penelitian regenerasi dan transformasi pada tanaman kedelai. Bul. AgroBio. 5:37-44.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, M. Herman, E. Listanto, Slamet. 2004. Transfer gen *proteinase inhibitor II* pada kedelai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.) J. Biotek. Pertanian 9:20-28.
- Parrott, W.A., G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, G.B. Collins, E.G. Williams. 1988. Optimization of embryogenesis and embryo germination in soybean. In Vitro Cell. Dev. Biol. 24:817-820.
- Parrott, W.A., E.G. Williams, D.F. Hildebrand, G.B. Collins. 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 16:15-21.
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos, V.M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 86:285-301
- Radhakrishnan, R., B.D. Ranjithakumari. 2007. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* L. Merr. cv CO3) via half seed explant culture. J. Agric. Technol. 3:287-297.
- Santarem, E.R., B. Pelissier, J.J. Finer. 1997. Effect of explant, pH, solidifying agent, and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 33:13-19.
- Santos, K.G.B., J.E. A. Mariath, M.C.C. Moco, M.H.B. Bodanese-Zanettini. 2006. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): Ontogeny of somatic embryos. Braz. Arch Biol. Technol. 4:49-55.
- Sopandie, D., Trikoesoemaningtyas, N. Khumaida. 2006. Laporan Eksekutif. Fisiologi, Genetik, dan Molekuler Adaptasi Kedelai terhadap Intensitas Cahaya Rendah: Pengembangan Varietas Unggul Kedelai sebagai Tanaman Sela. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat. Institut Pertanian Bogor.
- Tomlin, E., S.R. Branch, D. Chambelain, H. Gabe, M.S. Wright, C.N-JR. Steward 2002. Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 38:543-548.
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. The Plant Cell 5:1411-1423