

G/810/1992/015

**PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN  
BIJI MUDA *Glycine max* (L.) Merrill var. Orba  
PADA BERBAGAI KONDISI KULTUR *In vitro***

Oleh

**RETNO WIDJAJANTI**

**G24.0763**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**BOGOR**

**1992**

---

## RINGKASAN

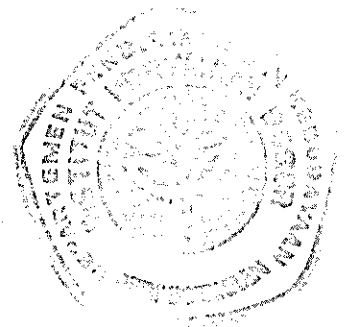
RETNO WIDJAJANTI. Pertumbuhan dan Perkembangan Biji Muda *Glycine max* (L.) Merrill varietas Orba pada Berbagai Kondisi Kultur *In vitro* (Di bawah bimbingan Dr. Ir. Diah Ratnadewi Lukman dan Ir. Ence Darmo Jaya Supena).

Penelitian bertujuan untuk melihat pengaruh jenis fisik medium, konsentrasi sukrosa, fotoperiodisitas dan umur biji terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji muda *Glycine max* var. Orba dalam kultur *in vitro*, dengan maksud untuk memperoleh teknik dan kondisi yang sesuai sebagai pendekatan terhadap kultur embrio hasil persilangan untuk keperluan penyelamatan embrio hibrid.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA, IPB. peubah yang diamati adalah persentase perkecambahan, pembentukan kalus, tunas, dan akar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis fisik medium dan konsentrasi sukrosa yang berbeda pada awal pengkulturan tidak menimbulkan perbedaan yang besar terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan, sedangkan perbedaan fotoperiodisitas dan umur biji berpengaruh nyata. Pada medium cair pertumbuhan radikula serta pembentukan tunas dari kalus lebih banyak terjadi dibandingkan pada medium padat. Pada medium padat tunas dapat berakar, tunas yang terbentuk umumnya abnormal yaitu tebal dan tidak mempunyai tangkai daun. Penanaman eksplan pada medium dengan konsentrasi sukrosa 100 g/l selama 2 minggu pertama kemudian dipindah ke sukrosa 30 g/l menumbuhkan kalus yang kemudian berakar. Penyimpanan kultur pada keadaan terang yang diawali gelap selama 2 minggu banyak menumbuhkan kalus dan kalus kemudian berakar. Umur biji 16 hari mengalami pertumbuhan dan perkembangan yang lebih baik dibandingkan umur biji 8 hari, terutama pada pertumbuhan radikula dan kalus yang kemudian bertunas.

---



**PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN  
BIJI MUDA *Glycine max* (L.) Merrill var. Orba  
PADA BERBAGAI KONDISI KULTUR *In vitro***

**RETNO WIDJAJANTI**

**G 24. 0763**

**Karya Ilmiah**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar**

**Sarjana Biologi**

**pada**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Institut Pertanian Bogor**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**BOGOR**

**1992**

Judul Karya Ilmiah : PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN BIJI  
MUDA *Glycine max* (L.) Merrill var. Orba PADA  
BERBAGAI KONDISI KULTUR *In vitro*

Nama Mahasiswa : RETNO WIDJAJANTI

Nomor Pokok : G 24. 0763

Menyetujui



Dr. Ir. Diah Ratnadewi Lukman

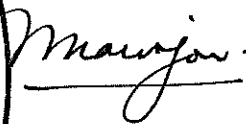
Pembimbing I



Ir. Ence Darmo Jaya Supena

Pembimbing II

Mengetahui



Dr. Ikin Mansjoer, MSc.

Ketua Jurusan

Tanggal Lulus : 05 DEC 1992

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 13 April 1968 di Purbalingga, Jawa Tengah. Penulis merupakan putri ketiga dari tiga bersaudara dari orangtua Sugeng Adi Sudarmo dan Kamdijah.

Pada tahun 1981 penulis lulus dari SD Kristen I Purbalingga, lalu pada tahun 1984 lulus dari SMP Negeri I Purbalingga, dan pada tahun 1987 lulus dari SMA Negeri I Purbalingga.

Pada tahun 1987 penulis diterima sebagai mahasiswa Institut Pertanian Bogor pada Tingkat Persiapan Bersama, melalui jalur PMDK. Pada tahun 1988 terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Mahaesa atas berkat, penyertaan dan kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah ini. Karya ilmiah ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA, IPB pada bulan Juli 1991 sampai dengan bulan Maret 1992.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Diah Ratnadewi Lukman dan Bapak Ir. Ence Darmo Jaya Supena sebagai pembimbing yang telah banyak membantu dalam melaksanakan penelitian sampai tersusunya karya ilmiah ini.
2. Ibu Ir. Utut Widyastuti, Ibu Dra. Isnaeni Nurwahyuni, Ibu Anis, Ibu Gleny dan karyawan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan serta karyawan Laboratorium Genetika-PAU yang banyak membantu pelaksanaan penelitian.
3. Kedua orangtua, kakak-kakak dan adik untuk kasih sayang, dorongan semangat dan doanya.
4. Ir. Debora, Ir. Esther, Dina, dan Fenty untuk bantuan, dorongan dan kasih persaudaraannya.
5. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu penulis selama penelitian hingga selesainya karya ilmiah ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa karya ilmiah ini masih banyak kekurangannya tetapi penulis berharap semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, November 1992

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
PENDAHULUAN .....	i
TINJAUAN PUSTAKA .....	i
Biji Kedelai .....	1
Kultur Jaringan Tanaman Kedelai .....	1
BAHAN DAN METODE .....	3
Waktu dan Tempat.....	3
Bahan dan Alat.....	3
Metode Penelitian .....	4
Pengamatan.....	5
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	5
Pengaruh Keadaan Fisik Medium.....	5
Pengaruh Konsentrasi Sukrosa .....	7
Pengaruh Fotoperiodisitas.....	8
Pengaruh Umur Biji.....	9
KESIMPULAN.....	10
DAFTAR PUSTAKA .....	10
LAMPIRAN .....	12

## DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Pengaruh Keadaan Fisik Medium terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan.....	6
2.	Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan.....	7
3.	Pengaruh Fotoperiodisitas terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan.....	8
4.	Pengaruh Umur Biji terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan.....	9

## Lampiran

1.	Komposisi Medium yang Digunakan .....	13
----	---------------------------------------	----



## DAFTAR GAMBAR

### Teks

1.	Biji Kedelai Tua .....	1
----	------------------------	---

### Lampiran

1.	Perkecambahan Biji 16 HSM pada Medium Cair, Sukrosa 30 g/l, Gelap/Terang .....	14
2.	Pembentukan Tunas Adventif Abnormal Biji 16 HSM pada Medium Padat, Sukrosa 100/30 g/l, Gelap/Terang .....	14
3.	Pembentukan Tunas Abnormal dari Kalus pada Biji 16 HSM .....	14
4.	Akar yang Terbentuk pada Kalus Biji 8 HSM di Medium Cair, Sukrosa 30 g/l, Gelap .....	15
5.	Perbedaan Warna Kalus yang Terbentuk pada Kotiledon Akibat Perbedaan Fotoperiodisitas .....	15

## PENDAHULUAN

Kedelai merupakan komoditi penting sebagai sumber utama protein nabati. Akan tetapi sampai saat ini produksi kedelai Indonesia belum mencukupi kebutuhan di dalam negeri. Berbagai cara telah dilakukan untuk meningkatkan produksi kedelai, baik secara ekstensif maupun intensif. Cara yang telah dilakukan antara lain melalui persilangan buatan untuk memperoleh varietas-varietas unggul yang berproduksi tinggi, berumur pendek, tahan terhadap hama dan penyakit, toleran terhadap tanah yang ber-pH rendah, dan beradaptasi baik pada lahan kering.

Salah satu varietas unggul yang telah banyak dibudidayakan adalah varietas Orba. Kedelai varietas Orba ini merupakan hasil persilangan antara varietas Davros dengan varietas Shakti (Somaatmadja, 1985).

Pada umumnya kedelai liar merupakan sumberdaya genetik yang mempunyai sifat menguntungkan antara lain tahan terhadap penyakit karat dan toleran terhadap kekeringan (Newell and Hymowitz, 1982). Persilangannya dengan kedelai terbudidaya diharapkan dapat meningkatkan keragaman genetik untuk memperoleh sifat-sifat yang lebih menguntungkan. Pada beberapa kasus polong hasil silangan gugur sebelum embrio dewasa karena adanya inkompatibilitas seksual. Masalah ini dapat diatasi dengan teknik kultur jaringan yaitu kultur embrio muda.

Kultur biji muda yang dilakukan dalam percobaan ini dimaksudkan untuk memperoleh teknik dan kondisi yang sesuai sebagai pendekatan terhadap kultur embrio hasil persilangan untuk keperluan penyelamatan embrio hibrid tersebut.

### Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh jenis media, konsentrasi sukrosa, pencahayaan, dan umur biji terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji muda *Glycine max* (L.) Merrill varietas Orba dalam kultur *in vitro*.

## TINJAUAN PUSTAKA

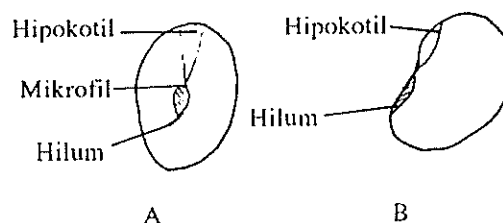
### Biji Kedelai

Biji kedelai terdiri dari dua bagian, yaitu kulit biji (testa) dan embrio. Kulit biji terdiri

dari tiga lapisan, yaitu epidermis, hipodermis, dan parenkima. Embrio terdiri atas dua kotiledon, plumula, dan poros hipokotil-bakal akar (Hidajat, 1985).

Kulit biji menutupi dan melindungi embrio. Pada kulit biji terdapat pusar biji (hilum) yang berwarna coklat, hitam atau putih (Hidajat, 1985). Hilum adalah bekas jaringan biji yang melekat pada dinding buah (Sumarno dan Harnoto, 1983). Pada ujung hilum terdapat mikropil, yaitu lubang kecil yang terbentuk pada saat pembentukan biji (Hidajat, 1985). Warna kulit biji bervariasi dari kuning, hitam, hijau atau coklat (Sumarno dan Harnoto, 1983).

Kotiledon merupakan bagian terbesar dari biji dan berisi bahan makanan cadangan yang hampir seluruhnya terdiri dari lemak dan protein yang berguna bagi pertumbuhan awal tanaman. Kotiledon dapat berwarna kuning atau hijau. Plumula terdiri dari dua daun sederhana dan titik tumbuh sedangkan poros hipokotil-bakal akar merupakan bagian embrio yang terletak di bawah kotiledon. Skema biji kedelai yang telah tua dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Biji Kedelai Tua (Carlson, 1973)

A. Sisi atas B. Sisi samping

### Kultur Jaringan Tanaman Kedelai

Kultur jaringan kedelai diantaranya digunakan dalam pemuliaan tanaman, misalnya untuk penyelamatan embrio hasil silangan (Tilton and Russell, 1984). Persilangan antara kedelai terbudidaya dengan kerabat liarnya bertujuan meningkatkan keragaman genetik untuk memperoleh bibit unggul (Singh and Hymowitz, 1985). Hambatan yang sering dijumpai dalam persilangan tersebut adalah gugurnya polong hasil silangan ketika embrio masih muda karena inkompatibilitas seksual, yang terjadi karena endosperma

gagal berkembang oleh ketidakseimbangan hormon di dalam embrio dengan jaringan induk (Evans and Wilson, 1984). Salah satu usaha yang dilakukan adalah penyelamatan embrio melalui teknik kultur jaringan.

Keberhasilan silangan antara *G. max* dengan kerabat liarnya kecil. Sebagai contoh silangan antara *G. max* dengan *G. canescens*, *G. clandestina*, *G. falcata*, dan *G. tabacina* mempunyai keberhasilan berkisar antara 0.5-2.5%, bahkan antara *G. max* dengan *G. latifolia* tidak terbentuk hibrid. Silangan *G. max* dengan *G. tomentella* mempunyai keberhasilan tertinggi, yaitu mencapai 15%. Spesies liar dapat digunakan sebagai tetua jantan maupun tetua betina dalam persilangan dengan *G. max*. Akan tetapi persilangan lebih berhasil jika *G. tomentella* sebagai donor serbuk sari (Newell and Hymowitz, 1982). Embrio hasil silangan antara *G. tomentella* dengan *G. max* tumbuh lambat pada medium kultur. Perkecambahan terjadi 5 sampai 19 minggu setelah dipelihara dalam medium kultur. Embrio yang digunakan sebagai eksplan jarang membentuk tanaman lengkap. Tanaman hibrid yang terjadi umumnya bersifat steril (Singh and Hymowitz, 1985).

Pada kultur embrio muda kedelai, umur embrio banyak berpengaruh terhadap keberhasilan pertumbuhan embrio. Umur embrio berkaitan erat dengan tahap perkembangan embrio yang terdiri dari zigot, globular, bentuk hati, kotiledon, dan kecambah. Jika embrio tahap globular digunakan sebagai eksplan, sekitar 10% dapat bertahan hidup menjadi embrio matang dan dapat memproduksi biji, 25% dapat menginisiasi hipokotil dan selanjutnya membentuk kalus. Embrio tahap kotiledon mempunyai keberhasilan 100% untuk berbunga dan menghasilkan biji jika digunakan sebagai eksplan (Tilton and Russell, 1984).

Beberapa tipe eksplan telah dicoba untuk tujuan perbanyak tanaman tetapi embrio muda lebih banyak digunakan dan berhasil membentuk tanaman (Barwale, Kerns, Widholm, 1986). Hal ini sesuai dengan Ranch, Oglesby, dan Zielinski (1986) yang mengatakan bahwa kemampuan morfogenik yang nyata dari kultur kedelai diinisiasi dari embrio muda.

### Medium

Dalam kultur jaringan komposisi medium yang digunakan mempengaruhi keberhasilan kul-

tur jaringan. Medium yang banyak berhasil menumbuhkan eksplan kedelai di antaranya medium PCL2 (Phillips and Collins, 1979) yang berhasil menumbuhkan embrio somatik dari kotiledon embrio muda *G. max*. Medium MS (Murashige and Skoog) dengan penambahan konsentrasi tertentu NAA, tiamin, dan prolin, meningkatkan embriogenesis somatik pada embrio muda *G. max* (Barwale *et al.*, 1986). Medium B5 (Gamborg) memberikan hasil yang baik pada perkecambahan embrio muda kedelai (Tilton and Russell, 1984).

Secara umum komposisi medium dapat dikelompokkan menjadi beberapa golongan yaitu unsur anorganik, sumber karbon dan energi, vitamin, nitrogen organik, dan zat pengatur tumbuh.

Unsur anorganik meliputi unsur-unsur makro dan unsur-unsur mikro. Unsur makro yaitu unsur yang digunakan dalam jumlah besar meliputi C, H, O, N, K, Ca, Mg, S, dan P (Gautheret, 1955). Selain unsur makro, unsur anorganik juga terdiri atas unsur-unsur mikro, yang walaupun diperlukan dalam jumlah sedikit namun keberadaannya sangat penting. Unsur-unsur mikro yaitu Fe, B, Mn, Cu, Co, dan Mo merupakan komponen protein sel tanaman yang penting dalam proses metabolisme dan proses fisiologi lain.

Sumber karbon yang umum digunakan adalah sukrosa yang merupakan sumber karbon terbaik diikuti oleh glukosa, maltosa dan rafinosa, menyusul kemudian fruktosa dan galaktosa. Manosa dan laktosa kurang baik sebagai sumber karbon (Gautheret, 1955). Konsentrasi sukrosa yang digunakan tergantung tahap perkembangan dan ukuran embrio. Embrio muda membutuhkan lebih banyak sukrosa (80-120 g/l), sedangkan embrio dewasa tumbuh baik pada sukrosa 20-30 g/l. Konsentrasi sukrosa yang digunakan menurun sejalan dengan peningkatan ukuran embrio (Pierik, 1987).

Sumber nitrogen organik yang digunakan dalam kultur jaringan adalah asam-asam amino. Glisin dan sistein paling umum digunakan dalam kultur jaringan. Medium yang mengandung glisin merangsang perakaran (Gautheret, 1955).

Auksin digunakan secara luas dalam kultur jaringan untuk merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ (Gunawan, 1988). Auksin dapat merangsang pembentukan akar dan menghambat pembentukan tunas, tetapi pengaruh penghambatan auksin dapat diperkecil

dengan meningkatkan konsentrasi komponen lainnya dalam medium seperti sukrosa, fosfat organik dan adenin (Brown and Thorpe, 1986). Penambahan 2,4-D, NAA, IAA atau IBA dalam medium kultur meningkatkan pembentukan jaringan meristematik pada eksplan kotiledon *G. max* (Lippmann and Lippmann, 1984).

Sitokinin berperan dalam pembelahan sel, yaitu hanya merangsang pembentukan daerah meristematik dan tidak berperan dalam pembentukan tunas organogenik (Wright *et al.*, 1986). Pada eksplan embrio muda *G. max* penambahan kinetin merangsang pembentukan kalus yang mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi akar, tetapi tidak dapat berdiferensiasi menjadi plantlet (Beversdorf and Bingham, 1977). Organogenesis dapat meningkat dengan pemberian BAP sebanyak 13.3  $\mu$ M pada medium MS (Barwale *et al.*, 1986).

Dari sejumlah vitamin, golongan vitamin B, terutama tiamin (vitamin B1) (Gunawan, 1988), piridoksin (vitamin B6) dan niasin (Murashige, 1974), lebih banyak digunakan pada medium kultur jaringan. Tiamin-HCl dan niasin dapat meningkatkan embriogenesis somatik pada eksplan embrio muda *G. max* (Barwale *et al.*, 1986).

Medium yang digunakan dapat berupa medium padat, semi padat atau cair. Medium padat umumnya untuk eksplan yang berukuran besar, sedangkan eksplan yang berukuran kecil menggunakan medium cair. Kalus kurang cepat tumbuh pada medium padat dibandingkan pada medium cair, tetapi morfogenesis tinggi bila kalus dipelihara pada medium padat (George and Sherrington, 1984).

### Morfogenesis

Regenerasi tanaman dapat terjadi melalui embriogenesis atau organogenesis, yang dipengaruhi oleh komposisi medium yang digunakan untuk menumbuhkan eksplan (Barwale, *et al.*, 1986).

Organogenesis adalah jalur yang ditempuh oleh suatu jaringan tumbuhan untuk menjadi tanaman lengkap dengan langsung membentuk organ-organ seperti akar dan pucuk (Gunawan, 1988). Organogenesis dicirikan dengan produksi primordia unipolar yang mempunyai hubungan langsung dengan tanaman induk. Primordia berkembang menjadi tunas vegetatif, dan tunas akan berakar melalui pembentukan primordia akar (Brown and Thorpe, 1986).

Ada dua jenis organogenesis yaitu organogenesis langsung dan organogenesis tidak langsung. Pada organogenesis langsung, tunas dan akar tidak terbentuk dari kalus tetapi langsung dari jaringan meristematik yang berkembang pada kotiledon. Pada organogenesis tidak langsung eksplan mula-mula diinduksi untuk membentuk massa kalus kemudian pada kalus tersebut terbentuk meristemoid yang tumbuh menjadi tunas (Brown and Thorpe, 1986).

Selain dipengaruhi oleh komposisi medium, keberhasilan organogenesis juga tergantung pada pemilihan eksplan dan lingkungan fisik (Brown and Thorpe, 1986). Murashige (1974) menyatakan bahwa hal-hal yang penting dalam pemilihan eksplan yaitu jenis jaringan yang digunakan, ukuran eksplan, kualitas tanaman yang digunakan, perlakuan awal dan genotip tanaman.

Embriogenesis somatik adalah proses terbentuknya embrio yang bukan berasal dari zigot. Pada kedelai, embrio dapat berasal dari kotiledon embrio muda (Lippmann and Lippmann, 1984), atau potongan hipokotil (Beversdorf and Bingham, 1977). Jika embrio muda ditempatkan pada medium, embriogenesis langsung dapat terjadi pada kotiledon atau dapat juga terbentuk kalus terlebih dulu yang kemudian menghasilkan embrio somatik (Barwale *et al.*, 1986).

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juli 1991 sampai bulan Maret 1992 bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor.

### Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan berupa biji muda *Glycine max* varietas Orba 8 hari dan 16 hari setelah bunga mekar (HSM), hasil penyerbukan sendiri.

Medium dasar yang digunakan adalah medium B5 yang dimodifikasi dengan penambahan 0.17 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.65 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2 mg/l glisin, 1 mg/l BAP, dan 0.64 mg/l kinetin (Tabel lampiran 1). Bahan kimia lain yang digunakan adalah larutan kloroks komersial, alkohol 70%, NaOH 0.1 N, dan HCl 0.1 N.

Alat-alat yang digunakan adalah botol kultur, labu takar, erlenmeyer, gelas piala, pipet mohr, pipet volumetrik, cawan petri, timbangan analitik, pH-meter, autoklaf, kotak pindah, alat-alat diseksi berupa gunting, pinset, dan skapel.

### Metoda Penelitian

Perlakuan dan penempatan eksplan yang dicobakan adalah sebagai berikut :

1. Keadaan fisik medium terdiri dari dua macam, yaitu medium padat dan medium cair dengan bantuan penyangga kertas saring.
2. Konsentrasi sukrosa terdiri dari dua macam, yaitu konsentrasi 30 g/l selama percobaan dan konsentrasi sukrosa 100 g/l kemudian setelah 2 minggu diganti medium dengan konsentrasi sukrosa 30 g/l.
3. Fotoperiodisitas terdiri dari dua macam yaitu keadaan gelap selama percobaan dan keadaan gelap selama 2 minggu, kemudian dipindah ke tempat terang.
4. Umur biji terdiri dari dua macam yaitu biji berumur 8 hari dan biji berumur 16 hari.

Untuk masing-masing biji berumur 8 dan 16 hari, perlakuan yang diberikan ialah sebagai berikut :

1	2	3	4
gelap	gelap	gelap	gelap
30 g/l	30 g/l	100 g/l ke 30 g/l	100 g/l ke 30 g/l
padat	cair	padat	cair
5	6	7	8
gelap ke terang	gelap ke terang	gelap ke terang	gelap ke terang
30 g/l	30 g/l	100 g/l ke 30 g/l	100 g/l ke 30 g/l
padat	cair	padat	cair

Untuk setiap perlakuan tersebut dilakukan 10 ulangan (botol) dengan satu eksplan tiap botol kultur.

### Persiapan Bahan Tanaman

*Glycine max* var. Orba ditanam dalam 10 buah pot yang masing-masing berisi tiga tanaman. Pemeliharaan yang meliputi penyiraman, pemupukan, penyiangan, pemberian pestisida untuk pengendalian hama dan penyakit dilakukan seperti cara bercocok tanam pada umumnya.

Pada hari pertama bunga kedelai mekar, bunga ditandai dengan cara mengikatkan benang pada pangkal tangkai bunga. Diasumsikan pada hari pertama bunga mekar itu terjadi penyerbukan sendiri. Polong diambil pada hari ke-8 dan ke-16 setelah bunga mekar.

### Sterilisasi peralatan dan pembuatan medium

Botol kultur, alat-alat diseksi dan alat gelas lainnya dicuci kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C, tekanan 17.5 psi selama 60 menit. Disertakan juga aquades untuk sterilisasi polong, kertas saring untuk medium cair, dan aluminium foil. Kertas saring dan aluminium foil dibungkus dengan kertas.

Medium B5 dengan modifikasi seperti tercantum dalam Tabel Lampiran 1 dimasukkan dalam gelas piala, kemudian ditambah aquades sampai volume tepat satu liter.

Derajat keasaman medium diatur menjadi pH 5.8. Untuk medium padat, ditambahkan agar 8 g/l dan dipanaskan dengan pengaduk bermagnet. Medium dituang ke dalam botol sebanyak 20 ml setiap botol. Pada medium cair diletakkan jembatan kertas saring dalam botol kultur. Kemudian medium disterilisasi dalam autoklaf selama 20 menit.

### Kultur biji

#### 1. Sterilisasi bahan tanaman

Polong yang telah dicuci dengan sabun direndam dalam alkohol 70% selama satu menit, lalu dibilas dengan aquades steril tiga kali. Kemudian berturut-turut direndam dalam kloroks komersial 20% dan 10% yang diberi dua tetes/100 ml tween 80 masing-masing selama 15 menit. Setiap kali setelah perlakuan dibilas aquades steril tiga kali.

## 2. Penanaman dalam medium

Polong yang telah disterilkan diletakkan pada cawan petri di dalam kotak pindah, kemudian biji diisolasi dari polong tersebut. Biji diambil dengan cara membuka kulit polong menggunakan pisau dan biji sedikit dilakai, kemudian diangkat dengan menggunakan pinset.

Biji yang telah diisolasi ditempatkan di atas jembatan kertas saring dalam botol kultur berisi medium cair atau di atas medium padat. Pada setiap botol kultur diletakkan satu eksplan. Botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan disimpan dalam ruang yang bersuhu antara 25 - 28 °C. Mula-mula semua botol kultur disimpan dalam keadaan gelap. Setelah 2 minggu sebagian dipindahkan ke rak berpenerangan cahaya putih dengan fotoperiodisitas 16 jam/hari, sumber dari lampu TL dengan intensitas cahaya sekitar 1000 lux, dan sebagian lagi tetap diletakkan di tempat gelap selama percobaan.

Selama percobaan tidak dilakukan subkultur, kecuali untuk eksplan yang mula-mula pada konsentrasi sukrosa 100 g/l dipindahkan ke konsentrasi sukrosa 30 g/l.

### Pengamatan

Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan meliputi perkecambahan, pembentukan kalus, tunas, akar dan pengamatan kualitatif lain. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 15 minggu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam kultur jaringan melalui berbagai tahapan. Perubahan yang mula-mula terjadi adalah pembesaran eksplan yang ditandai dengan membuka dan terkelupasnya selaput yang membungkus biji, kemudian diikuti oleh perpanjangan radikula dan membukanya kotiledon. Perubahan selanjutnya yaitu tumbuhnya kalus, tunas adventif, pucuk dari plumula embrio zigotik, atau akar. Tetapi tidak semua eksplan biji mengikuti pola pertumbuhan demikian. Sebagian eksplan tidak mengalami perkecambahan melainkan langsung membentuk kalus. Terdapat eksplan yang membentuk kalus diikuti tumbuhnya tunas atau akar pada kalus tersebut, dapat pula tumbuh

pucuk dari plumula, sedangkan akar tumbuh dari perpanjangan radikula. Pada setiap perlakuan yang dicobakan tidak semua pertumbuhan mengikuti pola yang sama.

Dari hasil pengamatan sampai minggu ke-15, kontaminasi terjadi sebanyak 10.78% dari seluruh eksplan yang dikulturkan. Kontaminasi terjadi pada minggu keempat dan kelima yang banyak dialami oleh biji yang diletakkan pada medium cair, konsentrasi sukrosa 30% selama percobaan, keadaan gelap selama percobaan dan biji berumur 16 hari. Kontaminasi yang tidak langsung terjadi setelah eksplan dikulturkan, dapat disebabkan oleh adanya kapang dan bakteri yang terbawa oleh eksplan yang tidak mati oleh sterilisasi permukaan polong kemudian berkembang selama pengkulturan. Biji yang berkecambah melakukan respirasi yaitu mengambil oksigen dan mengeluarkan karbondioksida dan uap air, sementara wadah yang tertutup tidak memungkinkan terjadinya pertukaran udara dengan lancar. Kelembapan relatif yang sangat tinggi atau kadar air yang jenuh mengakibatkan pengembunan uap air. Keadaan ini mendorong pertumbuhan mikroba pada eksplan (Murashige, 1974).

Eksplan yang tidak mengalami pertumbuhan dan perkembangan selama percobaan mencapai rata-rata 43.28%, yang sebagian besar terjadi pada biji yang berumur delapan hari. Pada umur delapan hari biji sangat kecil, umumnya berada dalam tahap perkembangan paling awal yaitu globular. Dalam tahap globular biji belum mempunyai kemampuan untuk hidup secara autotrof dalam arti memenuhi kebutuhannya sendiri untuk dapat bertahan dan berkembang dengan bahan-bahan yang tersedia di sekitarnya (Raghavan, 1980).

### Pengaruh Keadaan Fisik Medium

Pada keadaan fisik medium yang dicobakan, medium cair relatif lebih baik dibandingkan dengan medium padat, yang ditunjukkan dengan adanya morfogenesis yang lebih besar pada medium cair (Tabel 1.).

Perkembangan yang terjadi meliputi pemanjangan radikula, pembentukan tunas, pucuk, akar serta kombinasinya. Terbentuk juga kalus, baik pada medium padat maupun pada medium cair. Perkembangan ini mulai timbul pada minggu ketiga, yaitu pembentukan primordia tunas, kalus dan radikula, sedangkan akar baru

Tabel 1. Pengaruh Keadaan Fisik Medium terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan

Morfogenesis pada minggu ke-15	Medium		Keterangan
	Padat (%)	Cair(%)	
Kalus	5.00	7.50	tumbuh pada kotiledon
Pucuk	-	1.25	dari plumula embrio zigotik
Tunas	1.25	1.25	pada kotiledon
Radikula memanjang	-	5.00	
Akar	-	1.25	dari pemanjangan radikula
Kalus, tunas pucuk	1.25 *	6.25**	* tunas terbentuk dari kalus ** tunas dari kalus, pucuk dari plumula
Kalus, radikula	3.75	2.50	kalus pada kotiledon
Kalus, akar	2.50	1.25	akar terbentuk pada kalus dan dari pemanjangan radikula
Tunas, akar	1.25	-	akar terbentuk pada tunas
Kalus tunas, akar	-	1.25	kalus pada kotiledon, akar pada tunas
Membesar	30.00	18.75	

terbentuk pada minggu keenam pada medium padat dan minggu kesebelas pada medium cair. Eksplan yang hanya membentuk salah satu dari kalus, pucuk, tunas atau pemanjangan radikula atau kombinasinya lebih banyak terjadi pada medium cair. Hal ini dapat terjadi karena aerasi

pada medium cair lebih baik, juga karena nutrisi dalam bentuk cair lebih mudah diserap oleh eksplan, sehingga penyerapan nutrisi lebih efektif (George and Sherrington, 1984).

Kalus umumnya tumbuh pada kotiledon. Dalam perkembangan selanjutnya pada massa kalus tumbuh tunas atau akar. Menurut George and Sherrington (1984) pertumbuhan kalus pada medium padat kurang cepat dibandingkan pada medium cair.

Pada medium cair, tumbuh pucuk dari plumula embrio zigotik. Tunas yang tumbuh pada kalus dapat terjadi baik pada medium padat maupun medium cair. Tunas pada medium padat dapat berakar melalui pembentukan primordia akar.

Biji dalam kultur *in vitro* seringkali berkembang tidak normal. Pembesaran kotiledon mencapai ukuran yang sangat besar terutama pada medium cair yang diduga terjadi karena imbibisi yang sangat besar (Gambar Lampiran 1). Pada medium padat terjadi pemanjangan hipokotil yang pada mulanya tumbuh sejajar dan menempel pada medium, tetapi dalam perkembangan selanjutnya hipokotil tumbuh tegak. Penyebab pertumbuhan tidak normal ini belum diketahui, dan pola pertumbuhan ini hanya terjadi pada beberapa eksplan. Biji yang berkembang tidak normal dapat tumbuh menjadi tanaman kecil terutama pada medium padat.

Pembesaran kotiledon diikuti oleh pembentukan tunas pada kotiledon, dan setelah beberapa waktu akan menghasilkan tunas adventif dalam jumlah banyak yang tumbuh mengelompok (Gambar Lampiran 2). Pola pertumbuhan ini menunjukkan terjadinya organogenesis langsung pada eksplan. Tunas yang terbentuk tidak seperti pada tanaman kedelai normal yang mempunyai helai daun dan tangkai daun yang jelas. Helai daunnya nampak menebal. Beberapa tunas terbentuk dari kalus. Semua tunas yang terbentuk mempunyai persamaan yaitu tanpa tangkai daun dan tunas tumbuh mengelompok (Gambar Lampiran 3). Hal ini dapat disebabkan oleh penggunaan BAP 1 mg/l dan kinetin 0.64 mg/l, seperti dikatakan oleh George and Sherrington (1984) bahwa sitokinin mendorong pembentukan tunas adventif tetapi dalam perkembangan selanjutnya menginduksi percabangan abnormal. Dalam perkembangannya tunas pada medium padat mempunyai hipokotil tegak dan tumbuh menjadi tanaman kecil yang mempunyai bagian-bagian tanaman seperti akar, batang, dan daun yang mempunyai tangkai daun.

Tidak ada eksplan yang hanya membentuk akar pada medium padat, tetapi akar muncul pada kalus dan pada tunas adventif. Pada medium cair eksplan dapat membentuk akar dari perpanjangan radikula atau tumbuh pada kalus, tetapi tidak ada akar yang tumbuh pada tunas adventif (Gambar Lampiran 4). Sesungguhnya perakaran lebih kuat untuk menopang tanaman pada medium padat, karena pada medium padat akar yang terbentuk masuk ke dalam medium sehingga lebih kuat tertanam dalam medium. Pengaruh keadaan fisik medium antara medium padat dan medium cair terhadap perakaran berbeda. Cabang akar tidak tumbuh dan berkembang normal pada medium padat karena kurangnya aerasi, sebaliknya cabang akar terbentuk pada eksplan yang diletakkan pada medium cair dengan bantuan penyangga kertas saring.

#### Pengaruh Konsentrasi Sukrosa

Pada konsentrasi sukrosa yang dicobakan, morfogenesis eksplan yang ditempatkan pada medium dengan konsentrasi sukrosa 30 g/l selama percobaan dan eksplan yang ditempatkan pada konsentrasi sukrosa 100 g/l selama dua minggu pertama tidak memperlihatkan perbedaan yang besar (Tabel 2).

Rata-rata morfogenesis sedikit lebih tinggi pada konsentrasi sukrosa 100 g/l dua minggu pada awal pengkulturan. Hal ini dapat terjadi karena biji muda membutuhkan lebih banyak sukrosa sebagai sumber karbon dan energi pada awal kultur untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Pierik, 1987).

Eksplan yang hanya membentuk kalus, pucuk, tunas atau kombinasinya lebih banyak terjadi pada konsentrasi sukrosa rendah. Umumnya kalus terbentuk pada kotiledon, dan pucuk terbentuk dari plumula embrio zigotik. Tetapi ada beberapa tunas yang tumbuh dari kalus.

Eksplan yang hanya memanjang radikulanya banyak dialami oleh eksplan yang mula-mula pada konsentrasi sukrosa tinggi selama 2 minggu pertama, tetapi radikula kemudian berwarna coklat dan membusuk. Penyebab pembusukan ini belum diketahui. Eksplan yang hanya membentuk akar dari perpanjangan radikula, hanya terjadi pada konsentrasi sukrosa 30 g/l selama percobaan.

Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan

Morfogenesis Pada minggu ke-15	Konsentrasi Sukrosa		Keterangan
	30 g/l (%)	100 g/l ke 30 g/l (%)	
Kalus	7.50	5.00	tumbuh pada kotiledon
Pucuk	1.25	-	dari plumula embrio zigotik
Tunas	2.50	-	pada kotiledon
Radikula memanjang	1.25	3.75	-
Akar	1.25	-	dari perpanjangan radikula
Kalus, tunas, pucuk	3.75	2.50	tunas terbentuk dari kalus dan pucuk dari plumula
Kalus, radikula	2.50	2.50	kalus terbentuk pada kotiledon
Kalus, akar	1.25	5.00	akar terbentuk pada kalus dan dari pemanjangan radikula
Tunas, akar	-	1.25	akar terbentuk pada tunas adventif
Kalus, tunas, akar	-	1.25	kalus pada kotiledon, akar dari tunas
Membesar	23.75	25.00	

Akar pada umumnya terbentuk sebagai kelanjutan proses perkecambahan, walaupun ada sejumlah akar yang terbentuk pada kalus atau pada tunas adventif, dan hanya terjadi pada eksplan yang mula-mula diletakkan pada medium dengan konsentrasi sukrosa tinggi.



Potensial osmotik mempengaruhi morfogenesis. Potensial osmotik ini dipengaruhi oleh konsentrasi sukrosa dan konsentrasi garam-garam mineral yang ditambahkan ke dalam medium. Konsentrasi sukrosa dan garam mineral yang tinggi menghasilkan potensial osmotik yang tinggi di dalam medium. Potensial osmotik tinggi dapat meningkatkan inisiasi akar, tetapi konsentrasi sukrosa yang terlalu tinggi dapat menghambat perakaran. Konsentrasi sukrosa yang umum digunakan dalam kultur jaringan sekitar 20-30 g/l. Terlihat akar tidak terbentuk dari radikula pada eksplan yang diletakkan pada konsentrasi sukrosa 100 g/l. Akar baru terbentuk pada minggu keenam setelah eksplan dipindah ke medium dengan konsentrasi 30 g/l. Penghambatan ini diduga disebabkan oleh kelebihan tekanan osmotik dalam medium sehingga aliran nutrisi dari medium ke eksplan tidak berjalan lancar. (George and Sherrington, 1984). Penggunaan konsentrasi tinggi di atas 20 g/l dan konsentrasi sitokinin tinggi dapat menghambat pembentukan jaringan meristematik (Lippmann and Lippmann, 1984).

#### Pengaruh Fotoperiodisitas

Pada pencahayaan yang dicobakan, penempatan eksplan pada keadaan gelap terus-menerus menunjukkan rata-rata morfogenesis yang lebih tinggi, tetapi kurang bervariasi dibandingkan dengan eksplan yang diletakkan dalam keadaan gelap selama dua minggu kemudian dipindah ke keadaan terang (Tabel 3).

Pembentukan pucuk dari plumula dan tunas adventif pada kalus lebih tinggi persentasenya pada keadaan gelap terus menerus demikian pula perkecambahan karena kedelai termasuk salah satu spesies tanaman yang memerlukan keadaan gelap untuk perkecambahan. Pada keadaan gelap morfogenesis yang lebih dulu terjadi adalah pemanjangan radikula dan pembentukan kalus yaitu pada minggu ketiga, sedangkan pembentukan primordia tunas adventif terjadi pada minggu ketujuh. Pada keadaan terang yang diawali keadaan gelap selama dua minggu, pemanjangan radikula, pembentukan tunas, pucuk dan kalus terjadi pada minggu ketiga, sedangkan akar tumbuh pada minggu keenam.

Tabel 3. Pengaruh Fotoperiodisitas terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan

Morfogenesis Pada minggu ke-15	fotoperiodisitas		Keterangan
	Gelap (%)	Gelap ke terang (%)	
Kalus	5.00	8.75	tumbuh pada kotiledon
Pucuk	1.25	-	dari plumula embrio zigotik
Tunas	2.50	-	pada kotiledon
Radikula memanjang	2.50	2.50	-
Akar	-	1.25	dari perpanjangan radikula
Kalus, tunas pucuk	5.00	2.50	tunas terbentuk dari kalus dan pucuk dari plumula
Kalus, radikula	2.50	2.50	kalus terbentuk pada kotiledon
Kalus, akar	-	3.75	akar terbentuk pada kalus dan dari pemanjangan radikula
Tunas, akar	-	1.25	akar terbentuk pada tunas adventif
Kalus, tunas, akar	-	1.25	kalus pada kotiledon, akar pada tunas
Membesar	22.50	26.25	

Eksplan yang hanya membentuk kalus atau yang kemudian membentuk tunas berakar pada kalus tersebut banyak terjadi pada eksplan yang diawali dalam keadaan gelap selama dua minggu kemudian disimpan dalam keadaan terang. Keadaan terang mendorong pertumbuhan kalus.

Warna kalus lebih hijau dibandingkan eksplan yang diletakkan pada keadaan gelap selama percobaan (Gambar Lampiran 5 ).

Pucuk dari plumula embrio zigotik dan tunas dari kalus banyak terjadi pada keadaan gelap. Tunas dan pucuk yang terjadi pada eksplan yang diletakkan pada keadaan gelap selama percobaan berwarna hijau pucat, berbeda dengan eksplan pada keadaan terang yang berwarna hijau tua. Warna hijau pada tunas dan pucuk dipengaruhi oleh kandungan klorofil yang pembentukannya dirangsang oleh adanya cahaya.

Akar terbentuk dari radikula sebagai kelanjutan dari proses perkecambahan, dapat juga dari eksplan yang mempunyai diferensiasi tunas, tetapi sebaliknya tunas jarang terbentuk pada bagian jaringan yang telah membentuk akar. Pembentukan akar diinduksi pada keadaan gelap. Cahaya diperlukan dalam morfogenesis organ tanaman, tetapi cahaya tidak selalu menguntungkan secara langsung untuk menginisiasi pembentukan akar. Pembentukan akar dalam keadaan cahaya meningkat bila kultur diawali dalam keadaan gelap sesuai dengan yang dikatakan oleh George dan Sherrington (1984).

#### Pengaruh Umur biji

Perbedaan umur biji memberikan pola morfogenesis yang sangat berbeda pada eksplan yang dicobakan. biji umur 16 hari mempunyai rata-rata kemampuan tumbuh dan berkembang yang lebih tinggi daripada biji yang lebih muda yaitu umur delapan hari. Semua morfogenesis meliputi pemanjangan radikula, pembentukan pucuk, tunas, akar, kalus, dan kombinasinya lebih banyak terjadi pada biji berumur 16 hari (Tabel 4).

Biji umur 8 hari yang digunakan sebagai eksplan hanya berhasil membentuk kalus dan tahap awal morfogenesis yaitu hanya mengalami perubahan ukuran, sedangkan morfogenesis sangat kecil persentasenya. Pada biji umur 8 hari maupun 16 hari kalus mulai terbentuk pada minggu ketiga pada kotiledon. Eksplan dari jaringan muda masih mengalami pembelahan sel umumnya membentuk kalus lebih cepat daripada jaringan yang lebih tua, dan beberapa kalus kemudian membentuk organ. Eksplan biji muda lebih berhasil membentuk organ melalui kalus terlebih dulu, atau mengalami organogenesis tidak langsung. Sedangkan jaringan yang lebih tua dan

Tabel 4. Pengaruh Umur terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan

Morfogenesis Pada minggu ke-15	Umur Embrio		Keterangan
	8 hari (%)	16 hari (%)	
Kalus	6.25	6.25	tumbuh pada kotiledon
Pucuk	-	1.25	dari plumula embrio zigotik
Tunas	-	1.25	pada plumula
Radikula memanjang	-	5.00	-
Akar	-	1.25	dari perpanjangan radikula
Kalus, tunas, pucuk	-	6.25	tunas terbentuk dari kalus dan pucuk dari plumula
Kalus,radikula	1.25	3.75	kalus terbentuk pada kotiledon
Kalus, akar	2.50*	5.00**	*akar pada kalus **akar dari perpanjangan radikula kalus pada kotiledon
Tunas,akar	-	1.25	akar terbentuk pada tunas adventif
Kalus, tunas,akar	-	1.25	kalus pada kotiledon, akar pada tunas
Membesar	27.50	22.50	

mempunyai ukuran yang lebih besar cenderung membentuk organ tanpa melalui pembentukan kalus lebih dulu. Pada kotiledon tumbuh tunas adventif dan kemudian tunas tersebut berakar.

Biji umur 16 hari lebih banyak membentuk organ secara organogenesis langsung dibandingkan biji umur delapan hari.

Pembentukan pucuk yang berasal dari plumula pada biji berumur 16 hari terjadi pada minggu ketiga. Tunas dapat tumbuh pada kalus yang terbentuk lebih dulu. Pembentukan kalus dan pucuk atau tunas pada satu eksplan hanya terjadi pada eksplan yang diletakkan pada keadaan gelap kemudian dipindahkan ke keadaan terang. Kemampuan morfogenesis dipengaruhi oleh umur biji yang berhubungan langsung dengan ukuran dan tahap perkembangan embrio. Menurut Tilton dan Russell (1984), diduga biji berumur 8 hari mempunyai embrio yang berada dalam tahap perkembangan globular atau antara globular dan bentuk hati, sedangkan biji umur 16 hari mempunyai embrio yang berada dalam tahap perkembangan kotiledon. Embrio yang berada dalam tahap perkembangan kotiledon mempunyai kemampuan tumbuh dan berkembang yang lebih baik dan dapat membentuk plantlet dibandingkan dengan embrio tahap perkembangan lainnya. Tanaman mempunyai bentuk daun trifoliat, dan batang mempunyai banyak percabangan.

Perkecambahan terjadi pada minggu ketiga pada biji umur 16 hari, dan pada minggu ke-12 pada biji umur delapan hari. Eksplan yang tidak berkecambah dapat disebabkan oleh adanya dormansi fisiologis yang disebut juga dormansi embrio. Dormansi fisiologis tersebut terdapat pada embrio yang secara fisiologi belum matang. Faktor-faktor yang menyebabkan dormansi fisiologi antara lain adanya penghambatan perkembangan dan kurangnya keseimbangan antara hormon-hormon pertumbuhan. Dalam proses perkecambahan pertumbuhan radikula lebih cepat dibandingkan plumula dan umumnya radikula pertama muncul dari kulit biji yang terkelupas.

### KESIMPULAN

Medium B5 yang dimodifikasi dapat merangsang morfogenesis eksplan biji kedelai. Morfogenesis umumnya terjadi secara tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus lebih dulu, walaupun ada beberapa yang mengalami organogenesis langsung.

Pembentukan tunas dari kalus banyak terjadi pada medium cair, konsentrasi sukrosa 30 g/l

selama pengkulturan, keadaan gelap dan umur biji 16 hari, tapi tunas tersebut tidak normal. Sementara pembentukan kalus tinggi pada medium cair, konsentrasi sukrosa 30 g/l, keadaan gelap pada awal pengkulturan dan umur 16 hari.

Akar lebih banyak terbentuk pada medium padat, konsentrasi sukrosa 100/30 g/l, keadaan gelap pada awal pengkulturan dan umur biji 16 hari. Sedangkan perkecambahan banyak terjadi pada medium cair, konsentrasi sukrosa 30 g/l, keadaan gelap dan umur biji 16 hari.

Secara umum rata-rata morfogenesis lebih baik pada medium cair, konsentrasi sukrosa rendah, keadaan gelap pada awal pengkulturan dan biji umur 16 hari.

Pertumbuhan dan perkembangan pada percobaan ini belum mencapai hasil maksimal, terlihat dari besarnya persentase eksplan (43%) yang tidak mengalami perubahan morfologi selama pengkulturan dan eksplan yang hanya mengalami pembesaran kotiledon sampai akhir pengamatan. Juga belum diperoleh tanaman lengkap yang tumbuh normal dari perkembangan biji tersebut.

### DAFTAR PUSTAKA

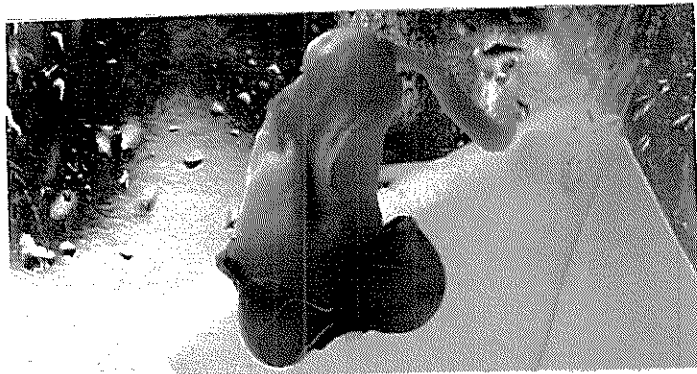
- Barwale, U.B., H.R. Kerns, and J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167 : 473 - 481.
- Beverdort, W.D. and E.T. Bingham. 1977. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop. Sci.* 17: 307-311.
- Brown, D.C.W., and T.A. Thorpe. 1986. Plant regeneration by organogenesis. p. 49-60. *In* Indra K. Vasil (ed). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic press, Inc.
- Carlson, J.B. 1973. Morphology. p. 17-95. *In* B.E. Caldwell *et al* (eds). *Soybean : Improvement, Production, and Uses*. Am Soc. Agr. No 16/ Agron. Madison, Wisconsin.

- Evans, P.K. and V.M. Wilson. 1984. Plant somatic hybridization. *Adv. Biol.* X: 1-57.
- Gautheret, R.J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 6 : 433 - 484.
- George, E.F., and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exergetics Ltd, London. 709 hal.
- Gunawan, L.W. 1988. Teknik kultur jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU-Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 304 hal.
- Hidayat, O.O. 1985. Morfologi tanaman kedelai. Hal 73-86. *Dalam* Sadikin Somaatmadja (ed). Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Hymowitz, T., and C.A. Newell. 1981. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybean. *Econ. Bot.* 35 : 272 - 288.
- Lippmann, B. and G. Lippmann. 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Report* 3: 215-218.
- Murashige. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 136 - 166.
- Phillips, G.C. and G.B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. sci* 19 : 59-64.
- Pierik, K.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 344p.
- Raghavan, V. 1980. Embryo culture. p.209-239. *In* I.K. Vasil (ed) Perspectives in Plant cell and tissue culture. Academic Press. New York.
- Ranch, J.P., L. Oglesby, and A.C. Zielinski. 1986. Plant regeneration from tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis. p. 97 - 110. *In* Indra K. Vasil (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, Inc.
- Singh, R.J. and T. Hymowitz. 1985. An intersubgeneric hybrid between *Glycine tomentella* Hayata and the soybean. *G. max* (L.) Merr. *Euphytica* 34:187-191.
- Somaatmadja, S. 1985. Peningkatan produksi kedelai melalui perakitan varietas. Hal. 243 - 251. *Dalam* Sadikin Somaatmadja (ed). Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Sumarno dan Harnoto. 1983. Kedelai dan cara bercocok tanamnya. Buletin Teknik No.6. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Tilton, V.R. and Sandra H. Russell. 1984. *In vitro* culture of immature soybean embryos. *J. Plant Physiol.* 115 : 191 - 200.
- Wright, M.S., M.G. Carnes, M.A. Hinchee, G.C. Davis, S.M. Koehler, M.H. Williams, S.M. Colburn, and P.E. Pierson. 1986. Plant regeneration from tissue cultures of soybean by organogenesis. p. 111-119. *In* Indra K. Vasil (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*. Academic Press, Inc.

## LAMPIRAN

Tabel Lampiran 1. Komposisi Medium yang Digunakan

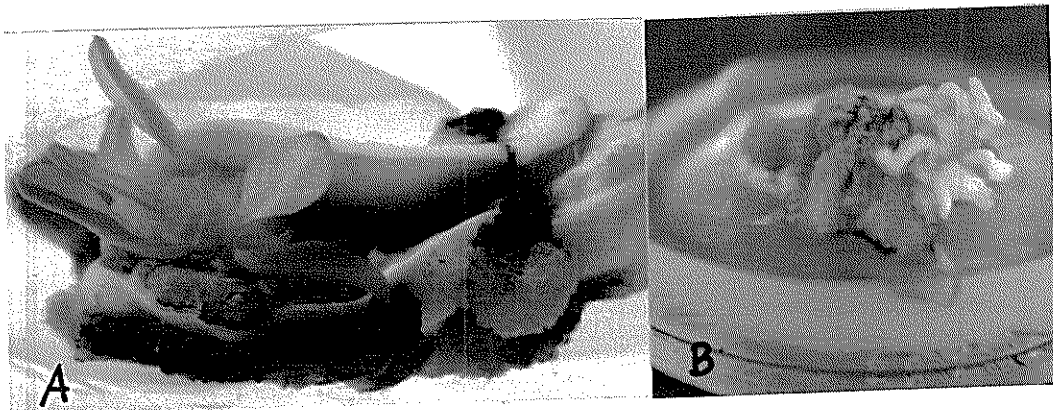
Bahan Kimia	mg/l	Bahan Kimia	mg/l
$\text{KNO}_3$	2500	$\text{FeSO}_4$	37.85
$\text{CaCl}_2$	150	Mio-Inositol	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	Thiamine-HCl	10
$\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150	Niacin	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	Pyridoxin-HCl	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{ZnSO}_4$	2	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3	Glycine	2
KI	0.75	BAP	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	kinetin	0.64
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	Sukrosa	30 000/100 000
NaEDTA	37.25	Agar	8 000
		pH	5.8



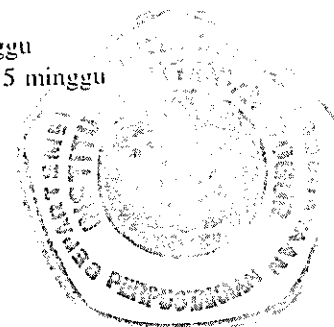
Gambar Lampiran 1. Perkecambahan Biji 16 HSM pada Medium Cair, Sukrosa 30 g/l, Gelap/Terang  
Kotiledon mengalami pembesaran  
Diamati pada minggu ke-8



Gambar Lampiran 2. Pembentukan Tunas Adventif Abnormal Biji 16 HSM pada Medium Padat, Sukrosa 100/30 g/l, Gelap/Terang Kultur 6 minggu. Bakal tunas tumbuh mengelompok dan hipokotil memanjang

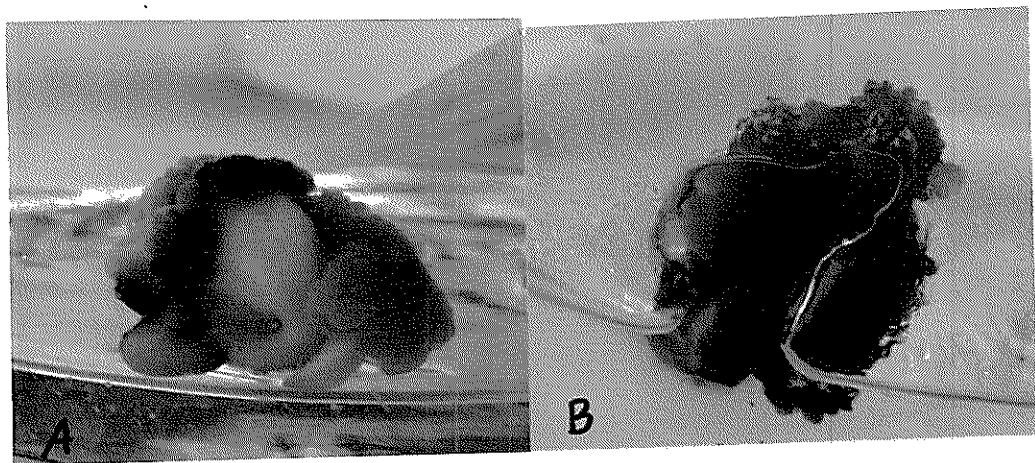


Gambar Lampiran 3. Pembentukan Tunas Abnormal dari Kalus pada Biji 16 HSM  
A. Medium Cair, Sukrosa 30 g/l, Gelap, Umur kultur 8 minggu  
B. Medium Padat, Sukrosa 100/30 g/l, Gelap, Umur kultur 15 minggu





Gambar Lampiran 4. Akar yang Terbentuk pada Kalus Biji 8 HSM di Medium Cair, Sukrosa 30 g/l, Gelap  
Umur kultur 15 minggu



Gambar Lampiran 5. Perbedaan Warna Kalus yang Terbentuk pada Kotiledon Akibat Perbedaan Fotoperiodisitas

- A. Medium Cair, Sukrosa 100/30 g/l, Gelap, Biji 16 HSM  
Umur kultur 8 minggu, Warna hijau pucat
- B. Medium Padat, Sukrosa 100/30 g/l, Gelap/Terang, Biji 16 HSM  
Umur kultur 8 minggu, Warna hijau tua