Hayati, Maret 2003, hlm. 19-24 Vol. 10, No. 1
ISSN 0854-8587

Metode Induksi Pembentukan Embrio Somatik dari Kotiledon dan Regenerasi Plantlet Kedelai Secara *In Vitro*

In Vitro Methods for Inducing Somatic Embryos of Soybean and Plantlet Regeneration

WAHYU WIDORETNO‡, ESTRI LARAS ARUMNINGTYAS‡, SUDARSONO*

Jurusan Budi Daya Pertanian, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 14 Mei 2002/Disetujui 17 September 2002

The objectives of this experiment were to obtain suitable medium for inducing primary and secondary somatic embryos of soybean, to evaluate embryogenetic response of 14 soybean genotypes (Dieng, Kerinci, Kipas Putih, Pangrango, Tambora, Tidar, B3628, B3639, B3731, MLG2805, MLG2999, MLG3072, MSC8606, and MSC9019) and to determine the frequency of somatic embryos convertion into soybean plantlets. Primary SE was induced from cotyledon of immature embryos while secondary SE was induced from primary SE, respectively, on modified MS medium containing 2,4-D and NAA. Maturation of SE was done on MS medium containing 1 g/l activated charcoal and germination of SE was conducted on MS medium containing GA_3 and BAP. The results showed primary SE induction from at least 13 soybean genotypes can be done by culturing soybean cotyledon on medium containing a combination of 10 ppm 2,4-D and 10 ppm NAA. On the other hand, primary SE induction from cotyledons of soybean cv. Pangrango can be done effectively on medium with 10 ppm NAA. For continuous SE induction, however, primary SE were initiated from cotyledons of soybean on medium containing 40 ppm 2,4-D followed by culturing primary SE on induction medium containing a combination of 10 ppm 2,4-D and 10 ppm NAA. Soybean plantlets were regenerated by culturing SE on maturation medium containing 1 g/l activated charcoal for one month followed by germinating matured SE on germination medium containing a combination of 2 ppm GA_3 and 2 ppm BAP for one week. Using those procedures induction of primary and secondary SE and regeneration of plantlet derived from three soybean genotypes (B3731, MSC8606, and Tidar) were obtained.

PENDAHULUAN

Regenerasi tanaman kedelai (*Glycine max* [L.] Merr.) hasil kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis (pembentukan tunas adventif) atau proses embriogenesis somatik (pembentukan embrio somatik) dari eksplan (Komatsuda 1992, Bailey *et al*. 1993). Frekuensi keberhasilan regenerasi plantlet hanya berkisar antara 25%-45% (Lippmann & Lippmann 1993, Trijatmiko & Harjosudarmo 1996). Frekuensi tersebut masih relatif rendah untuk mendukung penggunaan teknik kultur jaringan dengan tujuan mendapatkan varian somaklonal kedelai dengan sifat unggul tertentu. Untuk itu teknik *in vitro* yang dapat meregenerasikan plantlet dengan frekuensi lebih tinggi perlu dievaluasi.

Induksi embrio somatik (ES) primer pada kedelai dapat dilakukan langsung dari ekpslan kotiledon muda (Liu *et al*. 1992, Bailey *et al*. 1993), kotiledon tua (Wright *et al.* 1986) atau dari embrio zigotik yang masih muda (Shoemaker *et al.* 1991). Pembentukan ES secara berkelanjutan melalui induksi ES sekunder dari kalus embriogenik dan ES primer merupakan teknik *in vitro* yang diinginkan agar dapat lebih efektif untuk menghasilkan varian somaklonal (Raemaker *et al*. 1995). Untuk itu teknik *in vitro* yang dapat meregenerasikan ES sekunder dengan frekuensi tinggi perlu dikembangkan.

Sejumlah permasalahan diketahui menjadi kendala dalam budi daya kedelai di Indonesia, antara lain kekeringan, keracunan Al, serangan hama dan penyakit. Penggunaan teknik *in vitro* dan variasi somaklonal diharapkan dapat menjadi alternatif strategi untuk mengatasi berbagai kendala tersebut. Keberhasilan pengembangan teknik *in vitro* untuk menginduksi pembentukan ES sekunder pada berbagai genotipe kedelai yang dikembangkan di Indonesia akan mendukung usaha untuk mendapatkan tanaman varian somaklonal kedelai yang toleran terhadap stres biotik dan abiotik.

Dalam percobaan ini dievaluasi kemampuan pembentukan ES primer dari 14 genotipe kedelai yang dikembangkan di Indonesia. Genotipe kedelai tersebut mewakili berbagai kelompok karakter tanaman kedelai yang bervariasi (Kasim & Djunainah 1993). Penelitian ini bertujuan memperoleh media terbaik untuk menginduksi pembentukan ES primer dari eksplan kotiledon dan ES sekunder dari eksplan ES primer, mempelajari respons pembentukan ES primer dari 14 genotipe kedelai, dan menentukan frekuensi perkecambahan dan pembentukan plantlet dari ES kedelai hasil kultur *in vitro*.

‡ Alamat tetap: Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran 16, Malang 65145
* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-629353, Fax. +62-251-629353, E-mail: pertaipb@bogor.indo.net.id

BAHAN DAN METODE

Genotipe Kedelai. Penelitian ini menggunakan 14 genotipe kedelai yang terdiri atas enam kultivar unggul nasional (Dieng, Kerinci, Kipas Putih, Pangrango, Tambora, dan Tidar) dan delapan galur (B3628, B3639, B3731, MLG2805, MLG2999, MLG3072, MSC8606, dan MSC9019). Benih kedelai yang digunakan diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang dan Balai Penelitian Bioteknologi, Bogor. Masing-masing genotipe kedelai ditanam dalam pot plastik berisi media tanam campuran tanah:pasir:pupuk kandang (2:1:1) dan dipelihara di rumah plastik sampai menghasilkan polong. Polong muda dipanen dari tanaman kedelai umur dua bulan dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Induksi ES Primer. Eksplan kotiledon berasal dari embrio zigot 14 genotipe seperti tersebut di atas. Polong kedelai disterilkan dengan merendamnya di dalam larutan Bayclean 30% yang berbahan aktif NaClO 5.25% selama 15 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan air steril.

Eksplan kotiledon dengan panjang 2-3 mm dari 14 genotipe yang diuji dikulturkan dalam media induksi ES, yaitu media MS (Murashige & Skoog 1962) yang dimodifikasi dengan penambahan vitamin B5 (Gamborg *et al.* 1968), sukrosa 15 g/l dan NAA 10 ppm, 2,4-D 40 ppm secara sendiri-sendiri atau kombinasi NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm. Tiap botol berisi enam eksplan kotiledon dan untuk tiap kombinasi perlakuan diulang lima kali (total 30 eksplan yang dikulturkan pada lima botol untuk setiap kombinasi perlakuan). Eksplan kotiledon dipelihara selama satu bulan hingga terbentuk ES primer. Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan suhu antara 23^{o}C sampai 25^{o}C dan dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam.

Induksi ES Sekunder. Dalam percobaan ini hanya digunakan tiga genotipe kedelai (B3731, MSC8606, dan Tidar). Eksplan dan media yang digunakan sama dengan yang digunakan untuk induksi ES primer. Untuk menginduksi pembentukan ES sekunder, setiap ES primer yang terbentuk dipisahkan dari eksplan kotiledon dan dikulturkan dalam media induksi ES yang sama. ES primer dipelihara selama satu bulan hingga terbentuk ES sekunder. Dalam percobaan ini setiap botol berisi 10 eksplan ES primer dan untuk setiap kombinasi perlakuan diulang lima kali (total 50 eksplan yang dikulturkan pada lima botol untuk setiap kombinasi perlakuan). Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan suhu antara 23^{o}C sampai 25^{o}C dan dalam kondisi gelap.

Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Induksi ES Sekunder. Evaluasi pengaruh zat pengatur tumbuh (ZPT) terhadap pembentukan ES sekunder dari ES primer hanya dilakukan menggunakan kalus dari galur MSC8606. ES dikulturkan dalam media MS yang dimodifikasi tanpa atau dengan penambahan 2,4-D (10, 20, 30, dan 40 ppm) dan dengan atau tanpa penambahan NAA 10 ppm. Eksplan yang digunakan berupa kalus embriogenik berukuran 2-3 mm dengan 3-4 ES primer. Dalam setiap botol dikulturkan 10 eksplan dan untuk setiap kombinasi perlakuan diulang lima kali (total 50 eksplan yang dikulturkan pada lima botol untuk setiap kombinasi perlakuan). Eksplan ES dipelihara selama satu bulan hingga terbentuk ES sekunder. Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan suhu antara 23^{o}C sampai 25^{o}C dan dalam kondisi gelap.

Pengaruh BAP dan GA_3 terhadap Perkecambahan ES. Penentuan media yang optimum untuk mengecambahkan ES sekunder dilakukan dengan menggunakan satu genotipe kedelai, yaitu galur B3731. Kalus dengan ES sekunder yang terbentuk setelah empat minggu dalam media induksi ES dikulturkan dalam media MS dengan penambahan gula sukrosa 30 g/l dan arang aktif 1 g/l selama satu bulan agar terjadi perkembangan ES sekunder yang sempurna, yaitu ES dengan kotiledon dan radikula yang normal. Dari kumpulan ES yang berkembang dipilih 20-30 ES dengan ukuran 3-5 mm dan dikecambahkan dalam media perkecambahan yang mengandung garam makro dan setengah konsentrasi garam mikro penyusun media MS, vitamin B5, gula sukrosa 30 g/l, dengan penambahan kombinasi GA_3 2 ppm dan BAP (1, 2, 3, dan 4 ppm). Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan suhu antara 23^{o}C sampai 25^{o}C dan dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam. Media perkecambahan yang terbaik ditentukan berdasarkan pada frekuensi terbentuknya akar primer dan munculnya daun primer dari ES yang bertahan hidup dalam proses perkecambahan.

Pengaruh Genotipe terhadap Perkecambahan ES. Media perkecambahan ES terpilih digunakan untuk mengevaluasi respons perkecambahan ES dari tiga genotipe kedelai, yaitu B3731, MSC8606, dan Tidar. ES sekunder umur satu bulan dikulturkan dalam media MS dengan penambahan gula sukrosa 30 g/l dan arang aktif 1 g/l selama satu bulan untuk mendapatkan ES yang sempurna. Selanjutnya 20-30 ES yang didapat dikulturkan dalam media perkecambahan terpilih. Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan suhu antara 23^{o}C sampai 25^{o}C dan dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam. Efektivitas perkecambahan ditentukan berdasarkan frekuensi terbentuknya akar primer dan munculnya daun primer dari ES yang bertahan hidup dalam proses perkecambahan.

HASIL

Induksi ES Primer. Sebanyak 14 genotipe kedelai yang dievaluasi mampu membentuk ES primer dalam media induksi. Pada Tabel 1 disajikan kisaran persentase eksplan yang membentuk ES dan jumlah ES yang terbentuk per eksplan dalam media induksi dengan penambahan NAA 10 ppm, 2,4-D 40 ppm, atau kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm.

Kotiledon yang dikulturkan dalam media induksi ES dengan NAA 10 ppm umumnya berkembang membentuk ES berwarna kuning kehijauan langsung dari eksplan, tanpa pembentukan kalus embriogenik, yang tumbuh dari pinggir kotiledon dan bagian kotiledon yang dipotong. Ukuran ES yang tumbuh sekitar 2-5 mm, sebagian besar pada fase torpedo atau berbentuk seperti terompet dan telah membentuk struktur embrio lengkap dengan kotiledon dan radikula

Tabel 1. Respons pembentukan embrio somatik (ES) primer dari eksplan 14 genotipe kedelai dalam media induksi ES dengan penambahan NAA; 2,4-D atau kombinasi NAA dan 2,4-D

Genotipe kedelai	NAA 10 ppm		2,4-D 40 ppm		2,4-D 10 ppm + NAA 10 ppm	
	Pembentukan ES (%)	ES per eksplan	Pembentukan ES (%)	ES per eksplan	Pembentukan ES (%)	ES per eksplan
B3628	55.9e	1.6d	47.6f	4.4cdef	57.1e	7.2abcd
B3639	70.0cd	2.0cd	68.3cd	4.3cdef	79.0bc	3.3ef
B3731	60.4de	2.1bcd	94.0a	9.7ab	100.0a	9.4a
Dieng	71.7c	2.8abcd	61.8de	3.9def	92.0a	5.6cde
Kerinci	78.3bc	2.3bcd	6.7g	1.2ef	81.9b	10.4a
Kipas putih	97.1a	3.1abc	68.5cd	4.4cdef	72.2cd	8.5abc
MLG2805	55.1e	2.0cd	61.8de	3.7def	77.5bc	5.5cde
MLG2999	72.8c	3.0abc	94.0a	11.7a	81.9b	10.3a
MLG3072	70.0cd	2.9abcd	94.0a	7.8bc	73.8bcd	8.9abc
MSC8606	60.4de	3.4ab	61.8de	4.7cde	68.3d	4.8de
MSC9019	88.5ab	3.6a	84.7ab	5.8cd	97.1a	9.1ab
Pangrango	95.2a	2.8abcd	6.7g	0.8f	24.0f	1.0f
Tambora	88.5ab	2.5abcd	77.2bc	6.8bcd	94.0a	9.2a
Tidar	76.2c	2.5abcd	52.4ef	5.7cd	100.0a	5.8bcde

Angka yang diikuti dengan huruf sama untuk masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$

(Gambar 1a). Dalam media 2,4-D 40 ppm, kotiledon yang dikulturkan membentuk kalus embriogenik yang selanjutnya berkembang membentuk struktur globular sebagai tahapan awal pembentukan ES. Kalus embriogenik dan ES berwarna putih kekuningan berkembang dari seluruh permukaan kotiledon. Dalam media dengan kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm, eksplan yang dikulturkan berkembang membentuk kalus embriogenik dan ES pada fase globular dan torpedo (Gambar 1b). ES berwarna putih kekuningan berkembang dari seluruh permukaan kotiledon yang dikulturkan.

Dari 14 genotipe kedelai yang diuji, 12 genotipe mampu membentuk ES primer dengan persentase dan rata-rata jumlah ES per eksplan yang tinggi dalam ketiga macam media induksi (Tabel 1). Untuk kultivar Pangrango, induksi ES dari kotiledon hanya memberikan hasil baik dalam media yang mengandung NAA 10 ppm. Dalam media dengan 2,4-D 40 ppm atau kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm dihasilkan jumlah ES per eksplan yang rendah (Tabel 1). Untuk kultivar Kerinci, induksi ES sulit dilakukan dalam media dengan 2,4-D 40 ppm, tetapi induksi ES memberikan hasil baik dalam media dengan penambahan NAA 10 ppm atau kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm (Tabel 1). Genotipe kedelai B3731, MLG2999, MLG3072, Tambora, dan Kipas Putih merupakan genotipe kedelai yang relatif mudah untuk membentuk ES primer secara *in vitro*.

Induksi ES Sekunder. ES primer yang terbentuk dalam media dengan NAA 10 ppm tidak membentuk ES sekunder jika dikulturkan dalam media dengan NAA 10 ppm. Sedangkan ES primer yang terbentuk dalam media dengan 2,4-D 40 ppm berkembang membentuk kalus embriogenik dengan berbagai tahapan awal dari perkembangan ES sekunder pada media dengan 2,4-D 40 ppm (Gambar 1c). ES sekunder dengan struktur radikula dan plumula yang jelas hanya ditemukan dengan jumlah 3.9 ES per eksplan pada galur MSC8606 (Tabel 2). Sedangkan ES primer yang terbentuk dari kotiledon dalam media induksi dengan penambahan kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm, mampu membentuk rata-rata 26 ES sekunder per eksplan untuk B3731, 17.7 ES untuk MSC8606, dan 14.9 ES untuk Tidar (Tabel 2).

Tabel 2. Perkembangan ES primer membentuk ES sekunder tiga genotipe kedelai dalam media induksi embrio somatik (ES) dengan penambahan NAA dan 2,4-D

Genotipe kedelai	NAA + 2,4-D (ppm)	Jumlah ES sekunder per eksplan
B3731	10 + 0	0
	0 + 40	TD
	10 + 10	26.0
MSC8606	10 + 0	0
	0 + 40	3.9
	10 + 10	17.7
Tidar	10 + 0	0
	0 + 40	TD
	10 + 10	14.9

TD: ES tidak dapat dihitung karena berkembang menjadi kalus embriogen

Pembentukan ES sekunder dari eksplan ES primer sangat dipengaruhi oleh fase perkembangan ES primer yang digunakan sebagai eksplan. Eksplan ES primer dari kotiledon yang dikulturkan dalam media dengan NAA tidak dapat membentuk ES sekunder. Sedangkan ES primer yang terbentuk dalam media dengan 2,4-D atau kombinasi antara 2,4-D dan NAA mampu membentuk ES sekunder atau kalus embriogenik.

Pengaruh ZPT terhadap Induksi ES Sekunder. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 10 ppm cukup baik untuk menginduksi pembentukan ES sekunder dari eksplan ES primer pada galur kedelai MSC8606. Penambahan 2,4-D 30-40 ppm dalam media induksi meskipun mempunyai persentase pembentukan ES sekunder yang hampir sama, menghasilkan rata-rata jumlah ES sekunder per eksplan yang lebih rendah dibandingkan dengan 2,4-D 10 ppm (Tabel 3). Pengulturan ES primer dalam media dengan NAA 10 ppm tidak menghasilkan ES sekunder (Tabel 3).

Penambahan NAA 10 ppm yang dikombinasikan dengan 2,4-D 10-40 ppm dalam media induksi juga menghasilkan pembentukan ES sekunder dari ES primer. Media dengan kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm nyata menghasilkan jumlah ES sekunder per eksplan (59.2 ES) yang tertinggi (Tabel 3). Penambahan 2,4-D 30-40 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 10 ppm ke dalam media induksi ES berpengaruh negatif terhadap jumlah ES sekunder yang terbentuk per eksplan (Tabel 3). Dari hasil percobaan ini diketahui media terbaik untuk induksi ES sekunder dari ES primer galur MSC8606 adalah media dengan kombinasi 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm. Dalam media tersebut, eksplan ES primer yang dikulturkan mampu membentuk ES sekunder dengan frekuensi 76% dan dengan jumlah ES antara 38-67 ES per eksplan (Tabel 3).

Pengaruh BAP dan GA_3 terhadap Perkecambahan ES. ES sekunder kedelai yang terbentuk dalam media induksi sering kali belum sempurna perkembangannya sehingga perlu dikulturkan dalam media MS dengan penambahan arang aktif 1 g/l. ES yang telah masak ditandai dengan terbentuknya struktur embrio lengkap dengan kotiledon dan radikula. ES sekunder yang dikulturkan dalam media MS dengan penambahan 1 g/l arang aktif selama empat minggu mampu membentuk ES yang masak dan siap dikecambahkan (Gambar 1d).

Setelah dikecambahkan selama satu minggu pada media perkecambahan, ES yang telah masak mengalami pemanjangan hipokotil dan mulai membentuk akar dan daun primer (Gambar 1e). Evaluasi yang dilakukan terhadap media perkecambahan dengan penambahan kombinasi GA_3 2 ppm dan BAP 1, 2, 3, atau 4 ppm menunjukkan semua media tersebut dapat mengecambahkan ES sekunder galur kedelai B3731 yang dikulturkan dengan kisaran frekuensi antara 72.3%-80.5% (Tabel 4). Meskipun persentase perkecambahannya tidak berbeda nyata, media dengan penambahan kombinasi GA_3 dan BAP masing-masing 2 ppm menghasilkan kecambah dengan kualitas yang terbaik sehingga digunakan dalam percobaan selanjutnya.

Pengaruh Genotipe terhadap Perkecambahan ES. Media perkecambahan dengan penambahan kombinasi GA_3 dan BAP masing-masing 2 ppm mampu mengecambahkan ES sekunder dari tiga genotipe kedelai yang diuji (B3731, MSC8606, dan Tidar) (Tabel 5). Kecambah yang didapat berkembang menjadi plantlet dalam media MS dengan 1 g/l arang aktif dengan persentase rata-rata 79%. Perkembangan plantlet ditandai dengan pemanjangan epikotil, terbentuknya akar primer dan daun baru (Gambar 1f).

Tabel 3. Respons pembentukan Embrio somatik (ES) sekunder dari eksplan ES primer kedelai MSC8606 yang dikulturkan dalam media induksi dengan penambahan berbagai konsentrasi NAA dan 2,4-D. Eksplan ES primer diinduksi dari kotiledon yang dikulturkan dalam media dengan 2,4-D (40 ppm)

NAA + 2,4-D (ppm)	Eksplan dengan ES sekunder (%)	Jumlah ES sekunder per eksplan	
		Rata-rata	Kisaran
0 + 10	86.7a	18.3c	16-23
0 + 20	86.7a	11.4cde	8-16
0 + 30	82.7a	6.4de	3- 7
0 + 40	72.8bc	3.7e	3- 5
10 + 0	0e	0e	0
10 + 10	76.3b	59.2a	38-67
10 + 20	70.0c	36.5b	22-45
10 + 30	55.9d	15.3cd	7-24
10 + 40	31.7e	8.8de	5-12

Data yang diikuti dengan huruf sama untuk masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$

Tabel 4. Perkembangan embrio somatik (ES) genotipe kedelai B3731 dalam media perkecambahan dengan penambahan GA_3 dan BAP

GA_3 + BAP (ppm)	ES yang dikecambahkan	ES yang berkecambah	Persentase ES berkecambah (%)
2 + 1	13.0*	10.0	77.5
2 + 2	17.5	14.0	80.5
2 + 3	14.5	10.5	72.3
2 + 4	18.5	13.5	72.5

Data rata-rata untuk masing-masing peubah yang diamati tidak berbeda nyata

Tabel 5. Perkembangan embrio somatik (ES) genotipe kedelai B3731, MSC8606, dan Tidar dalam media perkecambahan dengan penambahan kombinasi GA_3 dan BAP masing-masing 2 ppm

Genotipe kedelai	ES yang dikecambahkan	ES yang berkecambah	Persentase ES berkecambah (%)
B3731	17.5	14.0b	80.5a
MSC8606	16.5	14.5b	87.7a
Tidar	24.5	19.5a	79.5a

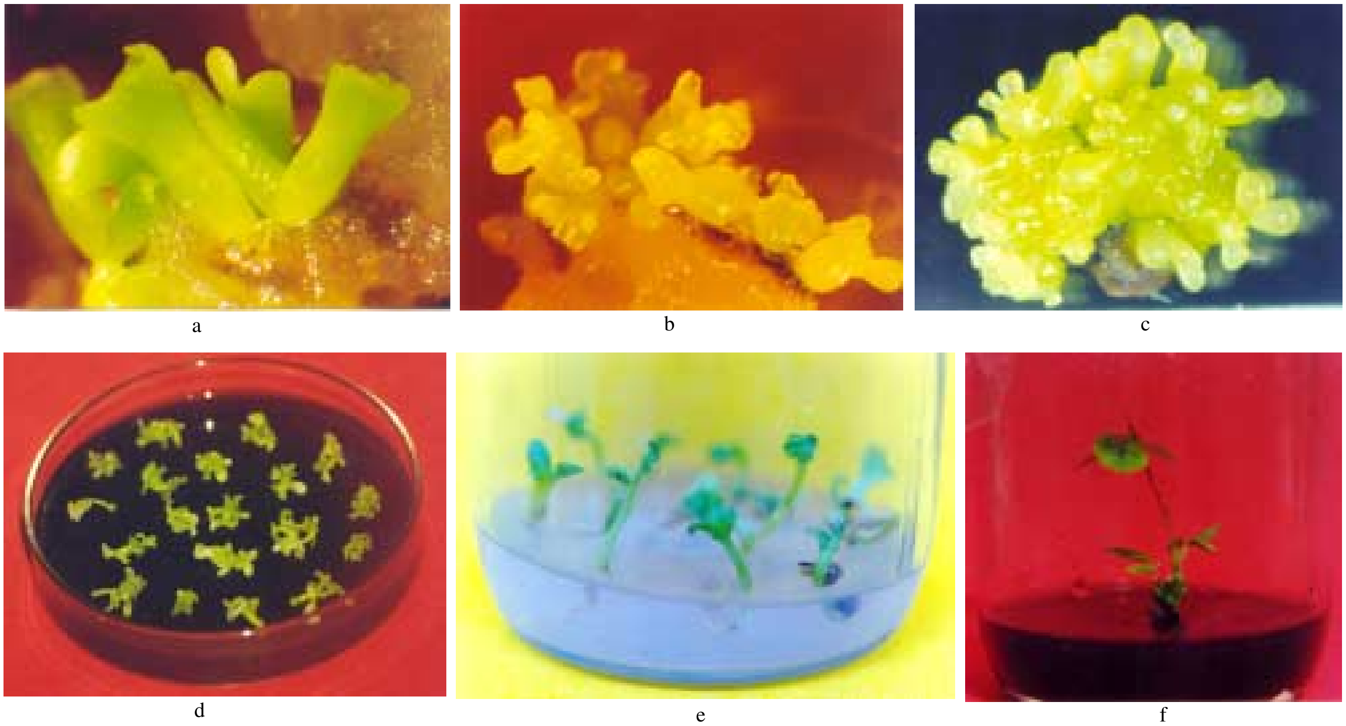
Data rata-rata yang diikuti dengan huruf sama untuk masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$

PEMBAHASAN

ES yang terbentuk dalam media dengan NAA dilaporkan berasal dari jaringan epidermis pada ujung distal eksplan kotiledon (Komatsuda 1992). Sebaliknya dalam media dengan 2,4-D, ES primer terbentuk dari jaringan eksplan yang lebih luas (Komatsuda *et al*. 1991, Komatsuda 1992). Hasil pengamatan dalam penelitian ini mendukung apa yang telah dilaporkan sebelumnya. Kotiledon yang ditanam dalam media dengan NAA membentuk ES primer dari bagian distal kotiledon sedangkan dalam media dengan 2,4-D atau kombinasi 2,4-D dan NAA membentuk ES dari sebagian besar permukaan eksplan.

Eksplan kotiledon yang ditanam dalam media yang mengandung 2,4-D dengan atau tanpa NAA membentuk ES lebih banyak dibandingkan dalam media dengan NAA. Selain itu, media dengan 2,4-D lebih cocok untuk menginduksi pembentukan ES sekunder dari ES somatik primer kedelai. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan 2,4-D merupakan auksin terbaik untuk menginduksi pembentukan ES dari eksplan dibandingkan dengan tipe auksin lain (IAA, IBA, dan NAA) (Ranch *et al.* 1986, Shoemaker *et al*. 1991). Sifat 2,4-D yang mudah diserap sel tanaman, tidak mudah terurai dan menjadi tidak aktif, berfungsi sebagai auksin yang kuat dan mampu mendorong aktivitas morfogenetika (Terzi & Loschiavo 1990) merupakan beberapa faktor pendukung 2,4-D lebih baik daripada tipe auksin lain. Penambahan 2,4-D pada konsentrasi 5-10 ppm dalam media induksi ES mampu menginduksi pembentukan ES dengan frekuensi yang tinggi dari eksplan (Barwale *et al*. 1986, Shoemaker *et al*. 1991). Sebaliknya konsentrasi 2,4-D antara 30-40 ppm cenderung menghambat pembentukan ES primer dan mengarahkan perkembangan eksplan ke arah pembentukan kalus embriogenik (Shoemaker *et al*. 1991).

Dalam percobaan ini, genotipe kedelai yang diuji memberikan respons yang berbeda dalam media induksi ES yang digunakan. Indikasi adanya perbedaan respons



Gambar 1. Pembentukan ES primer dari kotiledon dan ES sekunder dari ES primer dalam media induksi ES serta perkembangan ES dalam media maturasi dan perkecambahan. ES primer dalam media: a. dengan penambahan NAA 10 ppm, b. dengan kombinasi NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm, c. ES sekunder dalam media dengan kombinasi NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm, d. perkembangan ES setelah dikulturkan selama satu bulan dalam media dengan arang aktif 1 g/l, e. setelah dikecambahkan selama satu minggu dalam media perkecambahan dengan kombinasi GA_3 dan BAP masing-masing 2 ppm, f. plantlet yang berkembang dari ES kedelai yang siap diaklimatisasi.

pembentukan ES di antara genotipe kedelai telah dilaporkan (Bailey *et al.* 1993, Komatsuda & Ko 1990, Parrot *et al*. 1989). Perbedaan kemampuan membentuk ES dari berbagai genotipe tanaman dalam kultur *in vitro* terjadi akibat adanya perbedaan kompetensi regenerasi (Kielly & Bowley 1992, Taylor & Veilleux 1992) atau kondisi fisiologi dari jaringan eksplan yang digunakan (Komatsuda 1992, Lazzeri *et al*. 1987, Lippmann & Lippmann 1993). Kemampuan membentuk ES dari eksplan juga dilaporkan dikendalikan oleh faktor genetika (Merkle *et al*. 1990), yaitu oleh gen-gen sederhana (Krottje *et al*. 1996, Tar'an & Bowley 1997).

Penanaman ES dalam media yang mengandung arang aktif biasanya tidak diperlukan untuk mendapatkan plantlet dari ES, tetapi jika ES-nya masih dalam tahapan awal perkembangan penanaman ES dalam media dengan 1 g/l arang aktif perlu dilakukan agar kotiledon dan radikula dari ES berkembang normal. Auksin dan sukrosa merupakan komponen penting dalam tahapan perkembangan ES secara *in vitro*. Pada kedelai, penggunaan media maturasi tanpa auksin dan dengan 30-50 g/l sukrosa meningkatkan frekuensi pembentukan ES dengan kotiledon dan radikula sehingga siap dikecambahkan (Merkle *et al.* 1990, Komatsuda *et al*. 1991). Pengecambahan ES tanpa melalui tahapan penanaman dalam media dengan arang aktif dilaporkan menyebabkan terjadinya perkecambahan prematur sehingga menghasilkan plantlet yang lemah (Merkle *et al.* 1990, Raemakers *et al*. 1995).

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian dibiayai oleh Proyek Riset Unggulan Terpadu (RUT) VIII: Pengembangan Metode Seleksi *In vitro* dalam Membantu Pemuliaan Kedelai untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi, Republik Indonesia. No. Kontrak: 011.33/SK/RUT/2001, tahun 2001-2002.

DAFTAR PUSTAKA

Bailey MA, Boerma HR, Parrot WA. 1993. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In vitro Cell Dev Biol* 102:102-108.

Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.

Kasim H, Djunainah. 1993. Deskripsi varietas unggul palawija: jagung, sorgum, kacang-kacangan, dan ubi-ubian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian, Indonesia.

Kielly GA, Bowley SR. 1992. Genetic control of somatic embryogenesis in alfafa. *Genom* 35:474-477.

Komatsuda T. 1992. Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. *Bull Nat Inst Agrobiol Res* 7:1-7.

Komatsuda T, Kaneko K, Oka S. 1991. Genotype x sucrose interaction for somatic embryogenesis in soybean. *Crop Sci* 31:333-337.

Komatsuda T, Ko SW. 1990. Screening of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) genotype for somatic embryo production from immature embryo. *Japan J Breed* 40:429-251.

Krottje PA, Wofford DS, Quesenberry KH. 1996. Heritability estimates for callus growth and regeneration in desmodium. *Theor Appl Genet* 93:568-573.

Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tiss Org Cult* 10:197-208.

Lippmann B, Lippmann G. 1993. Soybean embryo culture: factors influencing plant recovery from isolated embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 32:83-90.

Liu W, Moore PJ, Collins JB. 1992. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. *In vitro Cell Dev Biol* 28:153-160.

Merkle SA, Parrot WA, Williams EG. 1990. Application of somatic embryogenesis and embryo cloning. Di dalam: Bhojwani SS (ed). *Development in Crop Science 19. Plant Tissue Culture:Application and Limitations*. Elsevier, New York. hlm 67-101.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised media for media rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.

Parrot WA, Williams EG, Hildebrand DF, Collins GB. 1989. Effects of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16:15-21.

Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93-107.

Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC. 1986. Plant regeneration from tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis. Di dalam: Vasil IK (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Pr, New York. hlm 97-110.

Shoemaker RC, Amberger LA, Palmer RG, Oglesby L, Ranch JP. 1991. Effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetid acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In vitro Cell Dev Biol* 27:84-88.

Tar'an B, Bowley SR. 1997. Inheritance of somatic embryogenesis in Orchardgrass. *Crop Sci* 37:1497-1502.

Taylor TE, Veilleux RE. 1992. In heritance of competencies for leafs disc regeneration, anther culture and protoplast culture in *Solanum phureja* and correlations among them. *Plant Cell Tiss Org Cult* 31:95-103.

Terzi M, Loschiavo F. 1990. Somatic embryogenesis. Di dalam: Bhojwani SS (ed). Development in Crop Science 19. *Plant Tissue Culture: application and limitations*. Elsevier, New York. hlm 54-65.

Trijatmiko KR, Harjosudarmo J. 1996. Regenerasi tanaman kedelai melalui embriogenesis somatik. *J Biotek Pertanian* 1:53-59.

Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA, Carnes MG. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep* 5:150-154.