

# PENGEMBANGAN TEKNIK *IMMATURE EMBRYO CULTURE* UNTUK MEMPERCEPAT FASE GENERATIF TANAMAN KEDELAI

Teguh Wijayanto, Gusti Ray Sadimantara, dan Dedi Erawan  
Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Haluoleo  
Kampus Bumi Tridharma, Anduonohu, Kendari, Sulawesi Tenggara 93232

## ABSTRAK

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan protokol untuk penyelamatan dan kultur embrio kedelai yang belum matang (*immature embryo rescue and culture*), yang pada akhirnya dapat membantu memperpendek siklus reproduktif dan secara umum siklus generasi tanaman kedelai. Untuk mencapai tujuan tersebut maka dilakukan tahapan penelitian, antara lain: 1) penanaman tanaman kedelai donor untuk mendapatkan *immature embryo*, 2) pembuatan media *in vitro* untuk kultur embrio, 3) pemanenan *immature embryo* dari tanaman donor, 4) sterilisasi dan penanaman *immature embryo* pada media kultur, 5) kultur dan pengamatan pertumbuhan *immature embryo*, dan 6) aklimatisasi dan penanaman di glasshouse. Berbagai perlakuan telah dicobakan, termasuk optimalisasi medium *in vitro*, untuk mendapatkan pertumbuhan embrio yang terbaik, penentuan umur polong, dan letak posisi biji dalam polong. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium dasar B5 dengan penambahan IBA baik untuk menumbuhkan *immature embryo* kedelai. Embrio kedelai umur 14 hari setelah pembungaan telah dapat digunakan sebagai eksplan, meskipun pertumbuhan plantlet-nya tidak sebaik dari embrio umur 21 hari. Plantlet yang tumbuh dari embrio sedang dicobakan untuk diaklimatisasi, untuk ditanam di greenhouse dan lapangan. Siklus hidup kedelai melalui teknik ini akan dibandingkan dengan siklus hidup yang normal.

**Kata kunci:** Fase generatif, kultur embryo, kedelai.

## PENDAHULUAN

Fase reproduktif tanaman kedelai membutuhkan waktu lebih dari 50% dari keseluruhan siklus hidup tanaman (Roumet and Morin, 1997). Berbagai teknik telah dikembangkan untuk memperpendek siklus hidup tanaman dengan tujuan untuk mendapatkan galur-galur homozigot dan varietas-varietas baru tanaman secara lebih cepat. Perkecambahan biji-biji kedelai yang belum masak (*immature*) pada fase kematangan fisiologi pernah dilakukan, tetapi tidak banyak menguntungkan karena kematangan fisiologi kedelai terjadi pada akhir siklus reproduktif (Tekrony *et al.*, 1979).

Teknik-teknik kultur embrio memiliki banyak kegunaan aplikatif dalam pemuliaan tanaman, disamping untuk studi-studi dasar di bidang fisiologi dan biokimia. Penyelamatan dan kultur embrio yang belum matang (*immature embryo rescue and culture*) adalah satu teknik yang menarik dan menjanjikan untuk mendapatkan tanaman-tanaman hasil persilangan seksual (*sexual crosses*), di mana kebanyakan embrio tidak bisa selamat secara *in vivo*. Hibridisasi tanaman menjadi sulit karena aborsi embrio pada fase perkembangan awal karena degenerasi embrio biji hasil persilangan (Ladizinsky *et al.*, 1979). Program-program pemuliaan tanaman juga banyak menggunakan hibridisasi interploid untuk menggabungkan sifat-sifat genetik yang diinginkan dengan tujuan untuk mengembangkan varietas tanaman yang lebih baik (Shen *et al.*, 2007).

Merakit sejumlah sifat terpilih menjadi sebuah varietas unggul tanaman bukan pekerjaan mudah, menuntut waktu yang panjang dan dana yang tidak sedikit. Kedelai di Indonesia umumnya membutuhkan waktu rata-rata sekitar 55 hari sejak pembungaan sampai panen (Purnawati dan Hidajat, 1994). Penyelamatan dan kultur *immature embryo* kedelai dapat dilakukan sejak 1-2 minggu dari fase pembentukan bunga/polong, sehingga secara keseluruhan dapat memperpendek

siklus generasi tanaman kedelai sekitar 40 hari. Melalui pendekatan ini maka dapat dilakukan penanaman kedelai lebih sering dalam setahunnya, yang akan bermanfaat bagi kegiatan pemuliaan tanaman.

Hasil penelitian terdahulu telah berhasil mengembangkan protokol untuk *embryo rescue* dan *kultur* tanaman chickpea dan lupin, yang merupakan tanaman golongan legum sebagaimana tanaman kedelai (Croser *et al.*, 2010). Protokol diatas juga telah dicobakan pada kedelai Australia, dan *immature* embrio kedelai memberikan respon yang positif terhadap medium *in vitro* yang biasa digunakan untuk tanaman lupin (Wijayanto, 2010), meskipun percobaan ini hanya singkat dilakukan berhubung keterbatasan waktu.

Titik penting penelitian ini adalah dikembangkannya satu teknik *in vitro*, khususnya penyelamatan dan kultur embrio kedelai Indonesia, yang secara signifikan dapat menunjang kegiatan pemuliaan tanaman kedelai di Indonesia melalui percepatan fase reproduktif tanaman dan penyelamatan embrio hasil persilangan dari aborsi.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan protokol dan teknologi untuk penyelamatan dan kultur embrio kedelai yang belum matang (*immature embryo rescue and culture*), yang pada akhirnya dapat membantu memperpendek siklus reproduktif dan secara umum siklus generasi tanaman kedelai tersebut.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Materi Tanaman**

Media tanam berupa campuran tanah, pupuk kandang dan pasir yang telah disterilisasi, digunakan untuk menumbuhkan tanaman kedelai didalam pot berdiameter 25 cm, di rumah kaca. Setiap pot ditanam sebanyak 4-6 benih, dan diberi air secukupnya setelah penanaman. Label dengan informasi nama varietas dan waktu penanaman ditempelkan pada pot tanaman. Tanaman dipupuk sekitar 2 minggu setelah tanam dan setiap 2 minggu berikutnya, sesuai rekomendasi dan dosis pemupukan. Intensitas cahaya dan temperatur diatur dengan penaungan agar tidak terlalu panas.

Benih kedelai yang digunakan dalam penelitian ini, diperoleh dari Balai Sertifikasi Benih, Sulawesi Tenggara. Beberapa varietas kedelai, seperti Grobogan, Wilis, dan Argomulyo diperoleh dan diuji viabilitas, umur berbunga dan lama panen (berdasarkan data sekunder). Dari data yang diperoleh, akhirnya dipilih varietas Argomulyo untuk digunakan dalam penelitian ini. Umur berbunga tanaman kedelai varietas Argomulyo sekitar 32-35 hari.

### **Pembuatan Stok Media Kultur *In Vitro***

Pembuatan media *in vitro* untuk kultur embrio kedelai mengikuti metode/media yang dikembangkan oleh Croser *et al.* (2010) dan Wijayanto (2010) dengan beberapa modifikasi.

### **Pengambilan *Immature* Polong**

Polong yang belum matang (*immature*) akan diambil secara hati-hati pada umur 14, 21, dan 28 hari setelah pembungaan, kemudian diletakkan dalam wadah yang telah berisi kertas saring basah untuk menjaga kelembaban selama proses transfer dari rumah kaca ke laboratorium. Pra-perlakuan desikasi polong dilakukan selama 3-4 hari, sebelum embrio diambil dari polong tersebut.

### **Teknik Sterilisasi Polong**

Prosedur sterilisasi standar yang dilakukan untuk polong lupin (Croser *et al.*, 2010) diterapkan untuk polong kedelai. Polong dicuci dengan etanol 70% selama 5 menit, kemudian dengan sodium hipoklorit 2,5% + 1 tetes Tween-20 selama 5 menit dengan pengocokan. Tahap akhir, polong dibilas 3 kali dengan air steril selama masing-masing 5 menit, kemudian dikering anginkan.

### **Isolasi atau Pengambilan Embrio**

Prosedur isolasi *immature* embrio pada prinsipnya seperti yang dilakukan Croser *et al.* (2010) dan Wijayanto (2010). Isolasi biji kedelai muda dari dalam polong maupun immature embrio dari dalam biji muda dilakukan secara aseptik di dalam laminar air flow cabinet, menggunakan dissecting mikroskop, petridish, forsep dan pisau bedah, yang semuanya telah disterilkan terlebih dahulu.

### **Kultur Immature Embrio**

Satu embrio dikulturkan dalam tabung polikarbonat ukuran 30 ml yang telah berisi 5 ml medium kultur padat + 1 ml medium cair, seperti diuraikan dalam Croser *et al.* (2010). Optimalisasi komposisi medium dan konsentrasi ZPT telah dicobakan untuk mendapatkan pertumbuhan planlet yang lebih baik. Segera setelah planlet mempunyai cukup akar, maka planlet siap diaklimatisasi di rumah kaca.

### **Variabel Pengamatan**

Variabel yang akan diamati antara lain:

- Persentase tumbuh (%) dan Kecepatan berkecambah (hari): waktu yang dibutuhkan untuk mulai berkecambah.
- Panjang akar (mm): panjang maksimum akar planlet, diukur tiap minggu.
- Jumlah akar: jumlah akar yang tumbuh, diukur tiap minggu.
- Jumlah daun: jumlah daun planlet yang tumbuh, diukur tiap minggu.
- Tinggi planlet (mm): tinggi maksimum planlet diukur tiap minggu.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

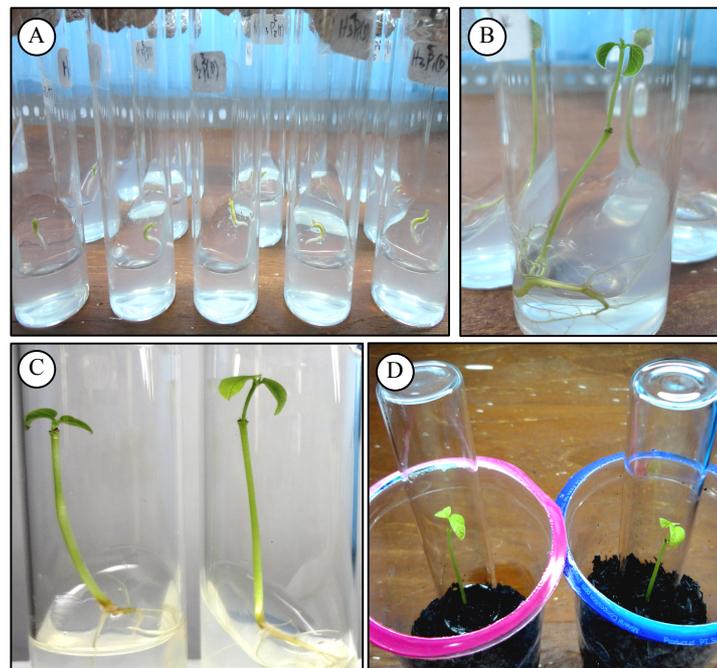
### **Pertumbuhan *Immature Embryo* dalam Medium *In Vitro***

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa *immature* embrio kedelai memberikan respon positif dan dapat tumbuh baik pada media kultur yang diberikan (Gambar 1), yang merupakan kombinasi medium padat (*solid underlay*) dan medium cair (*liquid overlay*). Medium padat yang digunakan pada dasarnya merupakan medium B5 (Gamborg *et al.*, 1968) yang umum dan baik digunakan untuk tanaman-tanaman legum seperti kedelai. Sementara medium cair mengandung unsur-unsur mikro medium dasar MS (Murashige & Skoog, 1962), vitamin menurut Gamborg *et al.* (1968), dengan penambahan hormon tumbuh GA3 dan IBA (~7.3  $\mu$ M). Hasil penelitian (Gambar 1) memperlihatkan pertumbuhan akar plantlet yang cukup baik, demikian pula dengan tunas (daun). Namun

hasil pengamatan (Tabel 1-4) menunjukkan bahwa daun plantlet kedelai mulai membuka sempurna mulai umur sekitar 2-3 minggu setelah kultur.

Penambahan hormon Sitokinin (BAP) pada medium cair (*liquid overlay*) yang bertujuan untuk meningkatkan pertumbuhan tunas/daun, justru berakibat negatif terhadap pertumbuhan plantlet, meskipun dengan konsentrasi yang kecil ( $0,5 \mu\text{M}$ ) (Tabel 1 dan Tabel 2). Perlu penelitian lanjutan, untuk mengetahui jenis dan konsentrasi sitokinin yang lebih tepat agar keseimbangan antara auksin yang dipakai (IBA) dengan sitokinin menjadi optimum sehingga pertumbuhan plantlet khususnya daun menjadi lebih baik.

Fase (umur) *immature* polong (embrio) juga berpengaruh terhadap pertumbuhan *immature* embrio dan plantlet kedelai. Tabel 3 dan 4 memperlihatkan bahwa meskipun *immature* embrio yang berumur 14 hari setelah pembungaan (antesis) telah dapat digunakan untuk *embryo rescue and culture*, namun persentase pertumbuhan dan perkembangan plantlet selanjutnya lebih kecil dan lebih lambat dibandingkan dengan menggunakan *immature* embrio yang berumur 21 atau 28 hari setelah antesis.



Gambar 1. Pertumbuhan plantlet kedelai hasil kultur immature embrio. A = immature embrio setelah 3 hari dimedium kultur, B dan C = Plantlet kedelai umur 14 hari, dan D = Plantlet kedelai yang mulai diaklimatisasi pada medium arang sekam padi.

**Tabel 1.** Pengaruh perlakuan konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan plantlet kedelai.

Perlakuan BAP	Persentase tumbuh	PA	JA	JD	TP
B0 (tanpa BAP)	100	55,50	6,75	0	38,25
B1 ( $0,5 \mu\text{M}$ )	100	19,00	1,00	0	26,50
B2 ( $5 \mu\text{M}$ )	100	19,00	1,00	0	15,50
B3 ( $10 \mu\text{M}$ )	100	16,75	1,00	0	15,25
B4 ( $20 \mu\text{M}$ )	100	12,75	0,75	0	10,25

PA = panjang akar (mm), JA = jumlah akar (buah), JD = jumlah daun membuka sempurna (helai) dan TP = tinggi plantlet (mm), pada pengamatan 5 hari setelah kultur.

**Tabel 2.** Pengaruh perlakuan konsentrasi BAP terhadap pertumbuhan plantlet kedelai.

Perlakuan BAP	Persentase tumbuh	PA	JA	JD	TP
B0 (tanpa BAP)	100	111,75	24,25	0,25	49,50
B1 (0,5 µM)	100	25,50	3,00	0	46,25
B2 (5 µM)	100	27,75	1,00	0	25,75
B3 (10 µM)	100	25,00	1,00	0	24,75
B4 (20 µM)	100	19,75	0,75	0	17,50

Persentase tumbuh (%), PA = panjang akar (mm), JA = jumlah akar (buah), JD = jumlah daun membuka sempurna (helai), dan TP = tinggi plantlet (mm), pada pengamatan 15 hari setelah kultur.

**Tabel 3.** Pengaruh perlakuan umur polong (embrio) setelah antesis terhadap pertumbuhan plantlet kedelai.

Perlakuan umur polong	Persentase tumbuh	PA	JA	JD	TP
H1 (14 hari)	33,3	18,5	5,0	0	21,7
H2 (21 hari)	100,0	48,0	12,0	0	26,3
H3 (28 hari)	100,0	83,0	16,0	0	44,8

PA = panjang akar (mm), JA = jumlah akar (buah), JD = jumlah daun membuka sempurna (helai), TP = tinggi plantlet (mm), pada pengamatan 10 hari setelah kultur.

**Tabel 4.** Pengaruh perlakuan umur polong (embrio) setelah antesis terhadap pertumbuhan plantlet kedelai.

Perlakuan umur polong	Persentase tumbuh	PA	JA	JD	TP
H1 (14 hari)	73,0	20,5	7,9	0,7	22,0
H2 (21 hari)	100,0	68,0	17,9	0,7	32,0
H3 (28 hari)	100,0	101,7	20,2	1,9	50,3

PA = panjang akar (mm), JA = jumlah akar (buah), JD = jumlah daun membuka sempurna (helai) dan TP = tinggi plantlet (mm), pada pengamatan 10 hari setelah kultur.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa metode *embryo rescue* pada kedelai berpotensi dalam program pemuliaan, yaitu memperpendek siklus reproduktif. Sedangkan metode kultur embrio membantu dalam persilangan *inter* dan *intra* spesies tanaman kedelai.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan dan disebarkan sebagai berikut:

1. *Immature* embrio kedelai memberikan respon positif terhadap kombinasi medium medium B5 dan medium L6 yang digunakan, dengan penambahan hormon IBA.
2. Umur (fase) *immature* polong (embrio) berpengaruh terhadap pertumbuhan *immature* embrio.
3. Perlu penelitian lebih lanjut tentang penambahan sitokinin pada medium, untuk meningkatkan pertumbuhan tunas (daun).
4. Perlu penelitian lebih lanjut tentang proses dan kondisi aklimatisasi yang baik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih terutama disampaikan kepada DP2M Dikti Kemdiknas dan Universitas Haluoleo yang telah mendanai kegiatan penelitian melalui skim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (AUPT), sesuai kontrak No: 22-9/PK-UPT/UNHALU/2012.

## DAFTAR PUSTAKA

- Croser, J., M.C. Castello, and K. Edwards. 2010. Lupin immature seed culture for generation acceleration. CLIMA report.
- Ladizinsky G, C.A. Newell, and T. Hymowitz. 1979. Wide crosses in soybeans: prospects and limitations. *Euphytica* 28:421-423
- Purnawati, E. dan J.R. Hidajat. 1994. Karakterisasi Plasmanutfah Kedelai. *Dalam Koleksi dan Karakterisasi Plasmanutfah Pertanian*. Balitbangtan.
- Roumet, P. and F. Morin. 1997. Germination of immature soybean seeds to shorten reproductive cycle duration. *Crop Sci.* 37:521-525.
- Shen, X., F.G. Gmitter Jr., and J.W. Grosser. 2007. Immature Embryo Rescue and Culture. Research report.
- Tekrony, D.M., D.B.E. Balles, J.T. Pfeiffer, and R.J. Fellows. 1979. Physiological maturity in soyabean. *Agron. J.* 71:771-775.
- Wijayanto, T. 2010. Laporan pelaksanaan kegiatan Program Academic Recharging di CLIMA, University of Western Australia.