

Regenerasi Massa Sel Embriogenik Kedelai yang Diseleksi dengan Polyethylen Glicol 6000 (PEG)

Ali Husni, Sri Hutami, Mia Kosmiatin, dan Ika Mariska

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Untuk meningkatkan produksi kedelai dapat dilakukan dengan perbaikan tanam-an yang adaptif terhadap lahan marginal antara lain lahan kering. Salah satu teknologi yang dapat digunakan adalah seleksi *in vitro* pada massa sel embrio-genik. Melalui teknologi ini dapat dihasilkan tanaman yang toleran terhadap cekaman biotik maupun abiotik. Pada penelitian ini dilakukan radiasi dengan sinar gamma (400 rad) pada eksplan embrio zigotik muda dan seleksi untuk cekaman kekeringan dilakukan dengan larutan PEG 6000 pada massa sel embriogenik yang dihasilkan. Penelitian pada tahap ini bertujuan untuk mendapatkan struktur embrio somatik kedelai yang adaptif terhadap PEG (0-75%). Kalus embriogenik dapat dihasilkan dari ketiga varietas kedelai yang digunakan (Sindoro, Wilis, dan Slamet) pada media M4C yang digunakan. Persentase keberhasilan pembentukan kalus paling tinggi dari ketiga varietas yang digunakan adalah Wilis sebesar 96,5%. Rata-rata struktur embrio somatik yang dihasilkan adalah sebanyak 4,13 untuk varietas Sindoro, 3,54 untuk varietas Wilis, dan 2,84 untuk varietas Slamet. Pemberian PEG pada media kultur dapat menyebabkan kematian biakan. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang digunakan maka semakin banyak jumlah struktur embrio somatik yang mati. Jumlah struktur embrio somatik yang dapat tumbuh setelah diseleksi dengan PEG adalah 18 pada varietas Sindoro, 42 varietas Wilis dan 36 varietas Slamet pada konsentrasi PEG 25%. Sedangkan jumlah struktur embriotik somatik pada perlakuan PEG 50% adalah 9 untuk varietas Sindoro, 20 varietas Wilis, dan 19 varietas Slamet. Jumlah total embrio somatik yang adaptif terhadap larutan PEG adalah 27 untuk Sindoro, 62 untuk Wilis, dan 55 untuk Slamet. Sampai saat ini, struktur embrio somatik tersebut sedang dikecambahkan untuk mendapatkan bibit somatik kedelai yang adaptif terhadap PEG.

Kata kunci: Kedelai, seleksi *in vitro*, lahan kering, PEG 6000

ABSTRACT

Improvement of soybean variety which tolerant to marginal as drought, can increase productivity. *In vitro* culture is one alternative technology to improve variety by selection of embryogenic cell mass. Using the technology produced plant which tolerant to biotic and abiotic stress. In this experiment explant of embryo zygotic was radiated by gamma rays (400 rad) and embryogenic cell mass were selected to water stress by PEG 6000 (0-75%). The aim of this experiment was producing embryo somatic structure of soybean, which adapted to PEG solution. Embryogenic callus were produced from three soybean varieties (Sindoro, Wilis, and Slamet) in M4C medium. The percentage of callus formation high was Wilis (96.5%). The rate of embryo structure production was 4.13 from Sindoro, 3.54 from Wilis, and 2.84 from Slamet varieties. PEG addition at the medium caused the death of culture. Increasing PEG concentration caused increasing the death of embryo somatic structure. The number of embryo somatic structure which tolerant to PEG 25% were 18 for Sindoro, 42 for Wilis, and 36 for Slamet varieties. Number of embryo somatic structure at PEG 50% were 9 for Sindoro, 20 for Wilis, and 19 for Slamet. Total number of embryo somatic structure, which adaptive to PEG solution were 27

for Sindoro, 62 for Wilis, and 55 for Slamet. The embryo somatic structure were grown for seedling right now to produce soybean somatic seed which adaptive to PEG.

Key words: Soybean, *in vitro* selection, dry land, PEG 6000

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycin max*) merupakan salah satu komoditas yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Permintaan akan komoditas ini terus meningkat dari tahun ke tahun. Kebutuhan kedelai di Indonesia diperkirakan 2,5 juta t/ha, sedangkan produksi dalam negeri hanya mampu memasok 40% dari yang dibutuhkan, sehingga sisanya (60%) harus diimpor untuk memenuhi kebutuhan.

Dengan laju kebutuhan yang terus meningkat setiap tahunnya menimbulkan tantangan yang berat bagi pembangunan pertanian kedelai. Tantangan ini semakin berat karena di satu sisi laju permintaan terus meningkat, akan tetapi di sisi lain muncul beberapa permasalahan antara lain keterbatasan lahan yang sempit sehingga dilakukan ekstensifikasi pada lahan marginal seperti lahan masam, lahan kering dan atau lahan yang kesuburannya rendah.

Untuk menghadapi tantangan yang semakin berat maka proses produksi pertanian kedelai terus dipacu dengan menggunakan lahan marginal agar dapat mencukupi kebutuhan dalam negeri. Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas kedelai di Indonesia adalah dengan penanaman kedelai pada lahan-lahan kering. Masalah kekeringan (*drought tolerance*) adalah hal yang sangat rumit, sehingga diperlukan suatu varietas yang mempunyai kemampuan untuk hidup dan berfungsi secara metabolis pada cekaman tersebut. Untuk itu, diperlukan suatu varietas atau galur kedelai yang toleran terhadap cekaman tersebut.

Keragaman somaklonal dapat menghasilkan individu-individu baru sebagai dampak dari instabilitas somatik selama pengkulturan. Keragaman dapat dipacu apabila kultur *in vitro* diinduksi dengan mutagen fisik atau kimiawi. Selanjutnya Nagatomi (1996) melaporkan bahwa dengan radiasi pada kultur *in vitro* dapat menyebabkan terjadinya mutasi non khimerik dengan peluang yang tinggi dan dapat menghasilkan genotipe baru yang tidak terdapat pada *gen pool* yang sudah ada.

Metode seleksi *in vitro* sangat cocok digunakan untuk mendapatkan tanaman kedelai yang toleran terhadap kekeringan, karena dapat dilakukan skrining pada sekelompok populasi (sekelompok sel) untuk mendapatkan sel mutan pada kondisi yang seragam pada lingkungan yang terbatas. Dalam hal ini, ada 3 hal penting yang perlu diperhatikan dalam seleksi *in vitro*. Pertama, sistem regenerasi pada sel atau kalus yang resisten hasil seleksi. Kedua, kemampuan sel/kalus untuk memelihara integritas genetik ketahanan pada material yang diseleksi. Ketiga, perubahan genetik pada proses seleksi tidak

hanya sekedar adaptasi fisiologis saja (Chopra *et al.*, 1989). Salah satu metode yang digunakan adalah penggunaan senyawa *osmotic stress* seperti polyethylen glycol (PEG) (Krizek, 1985; Santoz-Diaz dan Ochoa-Alejo, 1994; Dami dan Hughes, 1997).

Dalam upaya perbaikan tanaman kedelai untuk meningkatkan sifat toleransi terhadap kekeringan dengan cara memberikan kombinasi mutagen fisik (radiasi) dengan seleksi *in vitro* pada media yang mengandung PEG diharapkan dapat menambah komponen variasi yang tidak ditemukan di alam serta merubah sifat dari kultivar yang ada menjadi lebih baik. Melalui seleksi *in vitro* menggunakan PEG sebagai komponen seleksi pada massa sel embrionik akan menguntungkan, karena memberikan tekanan seleksi yang seragam pada populasi sel yang berjumlah jutaan. Penggunaan PEG dalam induksi stres air pada tanaman sudah digunakan sejak lama. Polyethylene glycol merupakan senyawa yang stabil, non ionik, polymer panjang yang larut dalam air dan dapat digunakan dalam sebaran bobot molekul yang luas (Lawyer, 1970). PEG dengan bobot molekul lebih dari 4000 dapat menginduksi stres air pada tanaman dengan mengurangi potensial air pada larutan nutrisi tanpa menyebabkan keracunan (Lawyer, 1970). Dengan sifat-sifat seperti yang disebut di atas PEG digunakan untuk menginduksi stres air dalam kultur *in vitro*. Short *et al.* (1987) menyatakan bahwa dalam kultur *in vitro* PEG dapat menginduksi stres air dan berkolerasi positif dengan yang terjadi di lapang atau rumah kaca.

Penggunaan metode seleksi *in vitro* pada perbaikan tanaman telah banyak digunakan untuk meningkatkan sifat ketahanan baik terhadap faktor biotik maupun abiotik (Stavarek dan Rains, 1984; Ahlowalia, 1986). Perbaikan tanaman melalui seleksi *in vitro* telah banyak dimanfaatkan pada berbagai tanaman dan telah terbukti dapat menghasilkan varietas baru yang tahan penyakit dengan sifat yang dapat diwariskan pada turunannya seperti pada tomat, alfalfa, seledri, dan pisang (Van den Bulk, 1991), gladiol, *Brassica juncea* yang toleran terhadap garam dan resisten terhadap toksin alternaria (Chopra *et al.*, 1989), dan panili yang toleran terhadap *Fusarium oxysporum* (Mariska *et al.*, 1999). Terjadinya perubahan sifat genetik dapat ditimbulkan pada fase sel bebas maupun massa sel embrionik pada tahap kultur *in vitro* atau pada eksplan karena adanya perubahan jumlah dan struktur kromosom, endomitosis, atau endoreduplikasi (Ahlowalia, 1986).

Tujuan jangka pendek dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode produksi kalus embrionik dan regenerasinya serta untuk mendapatkan struktur embrio somatik beberapa varietas kedelai hasil regenerasi kalus yang tahan PEG (kekeringan), sedangkan tujuan jangka panjang adalah untuk mendapatkan nomor-nomor baru kedelai yang tahan terhadap lahan kering.

BAHAN DAN METODE

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahap kegiatan agar penelitian dapat berlangsung dengan baik.

Penanaman Kedelai di Rumah kaca

Untuk mendapatkan embrio zigotik muda sebagai sumber eksplan, dilakukan penanaman kedelai dari ketiga varietas yang digunakan (Sindoro, Wilis, dan Slamet) di rumah kaca. Pemeliharaan dilakukan dengan cara pemberian pupuk NPK (50 : 100 : 50) pada saat tanam, penyiraman, dan penyemprotan insektisida selama pertanaman. Pemberian label dilakukan pada saat bunga mulai mekar untuk mendapatkan polong/biji muda yang diinginkan dari setiap varietas yang di-gunakan.

Isolasi Embrio Zigotik sebagai Eksplan

Polong muda yang telah dipanen dicuci dengan air sabun sampai bersih. Kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan bahan sterilan, seperti larutan dithane selama 1-2 jam, alkohol 70% selama 7 menit, HgCl₂ 0,2% selama 10 menit, clorox 30% selama 7 menit, dan clorox 20% selama 10 menit. Untuk membersihkan bahan-bahan sterilan yang masih tertinggal pada botol maupun polong dilakukan pembilasan dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Setelah itu, direndam dalam larutan bethadin sambil dilakukan pengupasan polong dan isolasi embrio zigotik.

Produksi Kalus Embriogenik

Embrio zigotik yang telah dihasilkan kemudian ditumbuhkan pada media kontrol (MS tanpa zat pengatur tumbuh). Kemudian dilakukan radiasi dengan sinar gamma di BATAN, Jakarta dengan dosis tunggal (400 rad). Setelah itu, dipindahkan kembali pada media M4C untuk mendapatkan kalus embriogenik. Embrio zigotik yang dikulturkan masing-masing sebanyak 395 embrio zigotik dari setiap varietas yang digunakan.

Parameter yang diamati pada tahap ini adalah jumlah dan persentase embrio zigotik yang dapat membentuk kalus dan kalus embriogenik setelah kultur berumur 4 minggu dan 8 minggu.

Seleksi Massa Sel Embriogenik yang telah Diradiasi dengan PEG

Massa sel embriogenik dengan struktur embrio somatik dari ketiga varietas kedelai yang dihasilkan pada percobaan sebelumnya (produksi kalus embriogenik) diseleksi/diskrining pada media M4C yang mengandung larutan PEG 6000 dengan konsentrasi 0, 25, 50, dan 75%. Seleksi dilakukan selama 2 bulan sehingga hanya embrio somatik yang benar-benar toleran/adaptif terhadap PEG yang dapat tumbuh, sedangkan yang tidak toleran akan mati karena dehidrasi (kekurangan air).

Parameter yang diamati pada tahap ini adalah persentase biakan yang dapat hidup dalam media seleksi dan jumlah struktur embrio somatik yang

adaptif terhadap PEG pada masing-masing varietas dari setiap perlakuan setelah kultur ber-umur 2 bulan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh beberapa informasi ke-majuan dari setiap tahap penelitian.

Sterilisasi dan Isolasi Embrio Zigotik

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan dalam kultur jaringan adalah memperoleh eksplan yang steril setelah dilakukan sterilisasi dan penanam-an dalam botol kultur. Hasil pengamatan yang dilakukan pada embrio zigotik muda yang diisolasi dan dikulturkan pada media pengkalusan disajikan pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa keberhasilan memperoleh embrio zigotik yang steril setelah dilakukan sterilisasi dan ditanam dalam botol kultur adalah varietas Wilis dengan keberhasilan 100% dengan jumlah 395 embrio zigotik. Kemudian disusul oleh varietas Slamet dan Sindoro, dengan keberhasilan masing-masing 44,05% dengan jumlah 174 dan 34,94% pada varietas Sindoro dengan jumlah 138 embrio zigotik.

Banyaknya embrio zigotik yang tidak steril (kontaminasi oleh bakteri) pada varietas Slamet dan Sindoro diduga disebabkan oleh banyak faktor, seperti pada saat isolasi embrio zigotik. Sterilnya embrio zigotik yang diperoleh sangat tergantung kepada kemampuan seseorang melakukan pekerjaan tersebut. Karena embrio zigotik muda kedelai relatif sangat kecil dan sulit di isolasi, sehingga diperlu-kan beberapa orang untuk melakukan isolasi untuk mendapatkan embrio zigotik yang banyak dalam satu hari sesuai dengan perlakuan. Kontaminasi dapat pula di-sebabkan varietas Slamet dan Sindoro lebih mudah diserang oleh penyakit yang tidak menimbulkan gejala, tetapi patogennya merupakan patogen internal yang akan muncul pada lingkungan yang menguntungkan bagi pertumbuhannya.

Tabel 1. Jumlah dan persentase embrio zigotik yang steril setelah dilakukan sterilisasi dan dapat mem-bentuk kalus pada media M4C dari setiap varietas, 4 dan 6 minggu setelah kultur

Varietas kedelai	Jumlah EZ yang ditumbuhkan	Jumlah/persentase EZ yang steril	Jumlah EZ yang steril	Jumlah/persentase EZ yang membentuk kalus
	4 minggu setelah kultur		Setelah radiasi (6 minggu setelah kultur)	
Sindoro	395	138 (34,94)	138	78 (56,52)
Wilis	395	395 (100)	174	168 (96,56)
Slamet	395	174 (44,05)	395	358 (90,63)

EZ = embrio zigotik

Radiasi dan Produksi Kalus Embriogenik

Radiasi pada penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan ke-ragaman genetik. Keragaman genetik yang muncul lebih pasti apabila dilakukan melalui jalur regenerasi embriogenesis somatik, karena terdapat utuh dalam indivi-du yang diperoleh dan diturunkan pada generasi berikutnya. Penggunaan radiasi sinar gamma untuk peningkatan keragaman genetik pada kultur *in vitro* telah banyak dihasilkan, baik keragaman yang tahan terhadap faktor biotik maupun abiotik.

Penggunaan media yang tepat dalam memperoleh kalus embriogenik sangat ditentukan oleh komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah M4C yang merupakan media yang paling baik untuk regenerasi kedelai (Mariska *et al.*, 1999). Hasil penelitian yang diperoleh pada tahap ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari tabel tersebut dapat dilihat, bahwa persentase keberhasilan embrio zigotik yang dapat membentuk kalus paling tinggi adalah Wilis sebanyak 96,56% dengan jumlah 168 kalus, kemudian Slamet 90,63% dengan jumlah kalus sebanyak 358 dan Sindoro 56,52% dengan jumlah kalus sebanyak 78 kalus.

Masing-masing kalus dari setiap varietas pada media pengkalusan (M4C) tidak semuanya membentuk kalus embriogenik. Hal ini diduga dipengaruhi oleh keadaan eksplan yang digunakan. Adanya perbedaan keadaan eksplan tersebut dapat terjadi pada saat sterilisasi ataupun selama isolasi embrio zigotik, meskipun umur panen polongnya sama. Banyaknya dan persentase kalus embriogenik dengan struktur embrio somatik yang terbentuk disajikan pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa perbedaan respon dari masing-masing varietas kedelai terhadap media induksi kalus. Respon kedelai varietas Sindoro untuk menghasilkan kalus embriogenik terhadap media induksi kalus yang diguna-kan lebih baik dibandingkan dengan varietas lainnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menyatakan bahwa varietas Sindoro merupakan varietas yang tingkat keberhasilan regenerasinya paling baik dengan persentase kalus embrioge-nik sebesar 39,74% (31 kalus embriogenik). Kemudian diikuti oleh varietas Wilis dengan persentase keberhasilan 22,02%

Tabel 2. Banyaknya dan persentase kalus yang dapat membentuk kalus embriogenik dengan struktur embrio somatik dari setiap varietas pada media pengkalusan (M4C), 8 minggu setelah kultur dan jumlah somatik (8 minggu setelah tanam)

Varietas kedelai	Jumlah EZ yang dapat membentuk kalus	Banyaknya kalus EG (%) yang terbentuk	Jumlah struktur embrio somatik	Rata-rata jumlah embrio somatik
Sindoro	78	31 (39,74)	128	4,13
Wilis	168	37 (22,02)	131	3,54
Slamet	358	55 (15,36)	156	2,84

EZ = embrio zigotik, EG = embriogenik

(37) dan varietas Slamet 15,36% (55 kalus embriogenik).

Apabila dilihat dari keberhasilan terbentuknya struktur embrio somatik dari kalus embriogenik yang dihasilkan, Sindoro juga merupakan varietas paling banyak menghasilkan struktur embrio somatik dengan rata-rata 4,13 dengan jumlah 128 struktur embrio somatik. Kemudian disusul varietas Wilis dengan rata-rata 3,54 dengan jumlah 131 struktur embrio somatik dan varietas Slamet dengan rata-rata 2,84 dengan jumlah 156 struktur embrio somatik (Tabel 2). Struktur embrio somatik yang terbentuk tahapannya mulai dari tahap globular sampai tahap hati.

Seleksi Kalus Embriogenik dengan Larutan PEG Secara *In Vitro*

Polyethylen glycol merupakan salah satu jenis osmotikum yang biasa digunakan untuk mensimulasi kondisi kekeringan, karena sifatnya yang dapat menghambat penyerapan air oleh sel atau jaringan tanaman. Selain itu, bobot molekulnya juga sangat besar (≥ 4000) sehingga tidak bersifat toksik karena tidak bisa diserap oleh jaringan tanaman (Dami dan Hughes, 1997). Untuk itu, pada penelitian ini digunakan larutan PEG sebagai penapis atau penyaring varian-varian yang muncul yang tahan terhadap cekaman kekeringan yang diakibatkan oleh kombinasi radiasi sinar gamma dengan kultur *in vitro*.

Hasil penapisan struktur embrio somatik yang diseleksi dengan penambahan larutan PEG pada konsentrasi 0, 25, 50, dan 75% dalam medium M4C dapat dilihat pada Tabel 3. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang digunakan, maka semakin kecil persentase kalus yang hidup pada ketiga varietas yang digunakan. Hal ini sesuai dengan sifat dari PEG, di mana semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin sulit sel/jaringan menyerap air yang mengakibatkan terhambatnya proses metabolisme sehingga menyebabkan kematian sel/jaringan. Hampir semua kalus dengan struktur embrio somatik yang tidak diperlakukan dengan PEG (0%) dapat

Tabel 3. Respon pertumbuhan dan perkembangan struktur embrio somatik dari tiga varietas kedelai yang diseleksi dengan larutan PEG selama 2 bulan

Varietas kedelai	konsentrasi PEG (%)	Persentase kalus yang hidup	Jumlah struktur embrio somatik hidup
Sindoro	0	100 (7/7)	45
	25	71,14 (5/7)	18
	50	28,57 (2/7)	9
	75	0 (0/7)	0
Wilis	0	100 (9/9)	48
	25	66,67 (6/9)	42
	50	33,33 (3/9)	20
	75	0 (0/0)	0
Slamet	0	93,3 (12/13)	52
	25	61,54 (8/13)	36
	50	30,76 (4/13)	19
	75	0 (0/0)	0

hidup dari ketiga varietas kedelai yang digunakan, kecuali Slamet dengan persentase hidup sebesar 93,3%. Hal ini disebabkan adanya kontaminasi pada saat subkultur pada media baru. Biakan yang diseleksi dengan larutan PEG konsentrasi 25 dan 50% ada yang hidup dan mati. Sedangkan biakan yang diperlakukan dengan PEG konsentrasi yang lebih tinggi (75%) semuanya mengalami kematian. Biakan yang dapat hidup diduga berasal dari sel yang toleran terhadap PEG akibat adanya perubahan sifat genetik karena 2,4-D, sel yang tidak berdiferensiasi dan radiasi, untuk biakan yang mati merupakan sel yang tidak toleran terhadap PEG. Biakan yang diseleksi dengan PEG dan mengalami stres ditandai dengan adanya bagian yang berwarna kecoklatan sampai coklat kehitaman sedangkan kalus yang tidak diseleksi dengan PEG berwarna segar kuning kehijauan.

Apabila dilihat dari perkembangan struktur embrio somatik yang adaptif terhadap PEG konsentrasi 25 dan 50% setelah dipindahkan pada media S11 memberikan warna yang kuning kehijauan dan hijau tua, sedangkan yang tidak diperlakukan dengan PEG berwarna kuning kehijauan.

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa jumlah struktur embrio somatik yang dapat tumbuh pada biakan yang tidak diperlakukan PEG lebih banyak daripada biakan yang diperlakukan dengan PEG pada ketiga varietas yang digunakan. Jumlah struktur embrio somatik adalah 45 pada varietas Sindoro, 48 pada varietas Wilis, dan 52 pada varietas Slamet. Jumlah struktur embrio somatik pada perlakuan PEG 25% adalah 18 pada varietas Sindoro, 42 varietas Wilis, dan 36 varietas Slamet. Sedangkan jumlah struktur embrio somatik pada perlakuan PEG 50% adalah 9 untuk varietas Sindoro, 20 varietas Wilis, dan 19 varietas Slamet. Jumlah total embrio somatik yang dapat hidup baik pada perlakuan PEG 25 dan 50% pada varietas Sindoro adalah sebanyak 28, 62 untuk varietas Wilis dan 55 untuk varietas Slamet. Saat ini, struktur embrio somatik kedelai yang adaptif terhadap PEG tersebut sedang dikembangkan pada media pendewasaan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kalus embriogenik dapat dihasilkan dari ketiga varietas kedelai yang digunakan dengan media M4C yang digunakan.
2. Persentase keberhasilan pembentukan kalus paling tinggi dari ketiga varietas yang digunakan adalah Wilis, yaitu 96,56%.
3. Pada media M4C rata-rata jumlah struktur embrio somatik yang dihasilkan sebanyak 4,13 untuk varietas Sindoro, 3,54 untuk varietas Wilis, dan 2,84 untuk varietas Slamet.

4. Pemberian PEG pada media kultur dapat menyebabkan kematian biakan. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang digunakan maka semakin banyak jumlah struktur embrio somatik yang mati.
5. Konsentrasi PEG 25 dan 50% dapat digunakan sebagai agen seleksi terhadap cekaman kekeringan terhadap struktur embrio somatik hasil keragaman somaklonal kombinasi fisik (radiasi) dengan kimiawi (ZPT) secara *in vitro*.
6. Total struktur embrio somatik kedelai yang adaptif terhadap PEG 25 dan 50% adalah 27 varietas Sindoro, 62 varietas Wilis, dan 55 untuk Slamet.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlowalia, B.S. 1986.** Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. *In* J. Semal (*Ed.*). Somaclonal Variation and Crop Improvement. Martinus Nijhoff Publisher, USA. p. 14-27.
- Chopra, V.L., S.B. Narasimhulu, P.B. Kirti, S. Prakash, and G. Anuradha. 1989.** Studies of somaclonal variation in *Brassica* spp. and its relevance to improvement of stress tolerance and yield. *In* A. Mujeeb-Kazi and L.A. Sitch (*Eds.*). Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988. International Maize and Wheat Improvement Center-International Rice Research Institute.
- Dami, I. and H. Hughes. 1997.** Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of "Valiant" grape. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 47:97-101.
- Krizek, D.T. 1985.** Methods of inducing water stress in plant. *Hort. Sci.* 20:1028-1038.
- Lawyer, D.W. 1970.** Absorption of polyethylene glycol by plants either effect on plant growth. *New Physiol.* 69:501-513.
- Mariska, I., D. Manohara, Hobir, M. Tombe, K. Mulya, M. Kosmiatin, A. Husni, R. Purnamaningsih, S. Rahayu, E.G. Lestari, dan Y. Rusyadi. 1999.** Peningkatan mutu genetik pada tanaman panili, lada, dan jahe. Laporan Hasil Penelitian Balitbio, Bogor.
- Nagatomi, S. 1996.** A new approach of radiation breeding toward improvement of disease resistance in crops. Prosiding Seminar Pengendalian Penyakit Utama Tanaman Industri secara Terpadu. JICA-Balitro, 13-14 Maret 1996. hlm. 16-24.
- Santoz-Diaz, M.S. and N. Ocha-Alejo. 1994.** PEG tolerant cell clones of chilli pepper: Growth osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 37:1-8.

- Short, K.C., I. Warburton, and A.V. Roberts. 1987.** *In vitro* hardening of cultures cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Hor. 2120:324-329.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984.** The development of tolerance cells to mineral stress. Hort. Sci. 19:377-382.
- Van den Bulk, R.W. 1991.** Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding-a review. Euphytica 56:269-285.