

Seleksi *In Vitro* untuk Toleransi terhadap Faktor Abiotik pada Tanaman Padi dan Kedelai

Ika Mariska dan Endang Gati Lestari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor

Abstrak

Salah satu upaya untuk memenuhi kebutuhan padi dan kedelai nasional adalah dengan melakukan ekstensifikasi penanaman ke lahan marginal (masam dan kering) yang tersedia cukup luas di Indonesia. Keragaman genetik varietas yang toleran lahan marginal masih sangat sempit. Sumber ketahanan terhadap lahan masam dan kering masih terbatas. Untuk mengatasi masalah tersebut maka dapat dilakukan melalui seleksi *in vitro*. Teknologi tersebut merupakan salah satu metode keragaman somaklonal namun lebih efektif dan efisien karena perubahan diarahkan kepada sifat yang diinginkan. Seleksi *in vitro* pada tanaman kedelai dilakukan pada kalus embriogenik yang diinduksi dari embrio zigotik muda varietas Slamet, Sindoro, dan Wilis kombinasi dengan radiasi sinar gamma 400 rad. Seleksi dilakukan dengan $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0-500 ppm) dan pH media 4. Media MS dimodifikasikan untuk unsur NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 dan Fe tidak chelat oleh EDTA. Regenerasi dilakukan pada media seleksi melalui jalur embriogenesis somatik. Benih somatik hasil seleksi diuji dengan tanah masam di rumah kaca, dan selanjutnya untuk generasi ke-2 sampai dengan generasi ke-4 diuji di lahan masam di Gajrug (Banten) dan Jasinga (Kabupaten Bogor). Untuk tanaman padi, kalus embriogenik berasal dari embrio zigotik varietas IR64 kombinasi dengan radiasi sinar gamma (0-700 rad). Seleksi dilakukan dengan PEG (BM6000) = 0-20%. Regenerasi dilakukan pada media seleksi. Biji generasi kedua yang berasal dari somatik kemudian diuji kembali dengan PEG 20%, daya tembus akarnya dengan campuran parafin : vaselin = 60-40% dengan ketebalan 3 mm. Di samping itu diuji kandungan prolina serta produksinya dalam kondisi cekaman kekeringan (60% dari kapasitas lapang). Hasil penelitian pada tanaman kedelai menunjukkan adanya kemampuan penurunan daya regenerasi dengan semakin meningkatnya konsentrasi Al. Benih somatik varietas Slamet umumnya mempunyai struktur yang tidak sempurna. Setelah aklimatisasi padi varietas Sindoro dan Wilis diperoleh 39 nomor. Dari 39 nomor tersebut diperoleh 12 nomor dari varietas Sindoro (Al 1000 ppm + 100 rad) yang mampu berproduksi. Generasi ke-2 dari nomor tersebut kemudian diuji di lahan masam. Pengujian di empat lokasi pada empat generasi menunjukkan adanya potensi yang besar untuk mendapatkan galur-galur harapan kedelai yang toleran Al dan pH rendah (lahan masam). Hasil seleksi *in vitro* pada tanaman padi diperoleh bahwa tidak semua kalus embriogenik dapat beregenerasi membentuk tunas adventif. Setelah dilakukan pengujian di rumah kaca diperoleh 13 somaklon IR64 yang diduga tahan kekeringan berdasarkan uji PEG dan uji daya tembus akar serta kandungan prolina yang tinggi. Setelah diuji lanjut dengan mengevaluasi produksi bulirnya maka diperoleh 8 somaklon yang toleran kekeringan dan produksi bulirnya tinggi, sedangkan kontrolnya tidak dapat berproduksi pada kondisi diberi cekaman kekeringan. Terdapat korelasi antara 3 karakter yang diuji (PEG, daya tembus akar, prolina) dengan toleransi terhadap kekeringan.

Kata kunci: *In vitro*, abiotik, padi, kedelai.

Pendahuluan

Padi dan kedelai merupakan komoditi strategis, setiap tahun Indonesia selalu mengimpor komoditi tersebut karena pasokan dalam negeri yang belum mampu memenuhi ke-

butuhan yang selalu meningkat. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah memanfaatkan lahan bermasalah antara lain lahan kering yang luasnya mencapai 12,8 juta hektar (Adisarwanto *et al.* 1995)

Masalah kekeringan pada musim kemarau sering menyebabkan rusaknya areal pertanaman padi dan menimbulkan kerugian sampai ratusan miliar (Suardi 1994). Dengan demikian, masalah kekeringan terdapat pada pertanaman padi gogo dan padi sawah. Salah satu kendala dalam pemanfaatan lahan kering atau terjadinya stress kekeringan selama fase pertumbuhan reproduktif mulai dari awal sampai pertengahan fase pengisian biji sering menjadi penyebab utama penurunan produksi kedelai (Doss *et al.* 1974; Price dan Courtois 1999). Sampai saat ini belum banyak varietas yang tahan pada lahan bermasalah dan beberapa galur masih dalam tahap pengujian. Karena masih sempitnya keragaman genetik terhadap cekaman kekeringan maka perbaikan tanaman dilakukan melalui seleksi *in vitro*.

Tingginya kebutuhan kedelai nasional tidak diimbangi dengan tingkat produktivitas yang tinggi pula. Hal ini menyebabkan Indonesia harus mengimpor sejumlah besar kedelai setiap tahunnya. Untuk menurunkan jumlah impor kedelai, Indonesia merencanakan untuk meningkatkan produksi kedelai, terutama dengan memanfaatkan lahan-lahan masam yang mencapai 102.8 juta hektar di seluruh Indonesia (Hidayat dan Mulyani 2002). Dari luas tersebut, lahan yang masih tersedia untuk ekstensifikasi pertanian sekitar 20 juta ha (Mulyani *et al.* 2003).

Masalah yang umum dihadapi pada pertanaman di tanah masam adalah kemasaman tanah yang rendah, keracunan Al, dan kekahatan hara seperti N, P, K, Ca, Mg, dan Mo serta kekurangan aktifitas mikroba tanah. Gejala umum keracunan Al adalah terhambatnya pertumbuhan akar sebagai akibat terhambatnya pemanjangan sel. Varietas kedelai yang umum digunakan petani memerlukan pH cukup tinggi (± 6) dan peka terhadap kandungan Al yang tinggi. Untuk mengembangkan pertanaman kedelai di lahan masam diperlukan varietas-varietas yang toleran terhadap pH rendah dan Al tinggi. Karena sumber ketahanan terhadap Al pada kedelai sampai saat ini sangat terbatas, maka perbaikan untuk karakter tersebut dilakukan melalui metode seleksi *in vitro*. Metode ini telah digunakan untuk meningkatkan sifat resistensi pada beberapa jenis tanaman, baik untuk cekaman biotik maupun abiotik (Stavarek dan Rains 1984; Ahloowalia 1986).

Keberhasilan menumbuhkan sel somatik yang mempunyai sifat totipotensi mempunyai nilai yang berarti dalam mendukung perkembangan pertanian melalui perbaikan tanaman untuk menghasilkan varietas unggul baru.

Seleksi *In Vitro*

Seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode keragaman somaklonal yang telah banyak dimanfaatkan untuk meningkatkan keragaman genetik. Metode keragaman somaklonal pertama kali dikemukakan oleh Larkin dan Scowcraft (1981), yaitu keragaman genetik yang ditimbulkan dari sel somatik dan potensial digunakan dalam pemuliaan untuk merakit varietas baru. Perbaikan tanaman melalui kultur *in vitro* saling melengkapi dengan pemuliaan secara *in vitro*.

Perbaikan tanaman melalui keragaman somaklonal telah banyak dilakukan antara lain untuk sifat ketahanan terhadap faktor biotik maupun abiotik. Ahloowalia (1986) meny-

takan bahwa cara tersebut berguna bila dapat menambah komponen keragaman genetik yang tidak ditemukan di alam serta merubah sifat dari kultivar yang ada menjadi lebih baik terutama untuk tanaman yang diperbanyak secara vegetatif atau menyebarkan sendiri.

Keragaman somaklonal dapat dicapai melalui kultur protoplas, kultur sel, regenerasi langsung, dan seleksi *in vitro*. Individu dalam populasi yang dihasilkan dari keragaman somaklonal disebut somaklon. Seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode dari variasi somaklonal, namun cara tersebut lebih efektif dan efisien karena perubahan lebih terarah kepada penyaringan sifat yang diinginkan. Dengan kultur *in vitro* berbagai sel varian dihasilkan dan diseleksi dengan komponen seleksi tertentu. Frekuensi diperolehnya somaklon yang diinginkan dapat meningkat karena intensitas seleksi yang efektif dan homogen terhadap massa sel yang diberikan (Specht dan Graef 1996).

Melalui metode keragaman somaklonal maka sel varian dapat diinduksi dan selanjutnya diseleksi dengan komponen seleksi yang ada dalam media. Variasi somaklonal merupakan hasil kumulatif dari mutasi genetik pada eksplan dan yang diinduksi oleh kondisi *in vitro*.

Keberhasilan penggunaan teknik seleksi *in vitro* untuk mendapatkan tanaman yang toleran terhadap cekaman abiotik memerlukan tersedianya:

1. Keragaman di tingkat sel/jaringan.
2. Metode seleksi *in vitro* untuk identifikasi sel yang toleran cekaman kekeringan.
3. Metode regenerasi sel/jaringan yang toleran menjadi tanaman (Widoretno dan Wahyu 2003).

Perubahan genetik dapat terjadi selama periode kultur *in vitro* atau karena adanya sel-sel yang bermutasi pada jaringan induknya (Ahloowalia 1986; Evans dan Sharp 1986). Daud (1996) menyatakan bahwa mutasi spontan pada sel somatik berkisar 0,2-3%. Menurut Amberger *et al.* (1992), persentase variasi somaklonal pada kedelai mencapai 8%. Di samping itu, pada tanaman yang sama persentasenya mencapai 2-7% untuk karakter kandungan minyak dan 2,5-7% untuk kegenjahan umur panen (Hawbaker *et al.* 1993). Selanjutnya Duncan *et al.* (1995) pada tanaman sorgum variasi somaklonal dapat mencapai 39%. Keragaman tersebut dapat ditingkatkan dengan berbagai perlakuan antara lain pemberian mutagen (baik fisik seperti radiasi sinar gamma maupun kimiawi seperti EMS, ES, DEMS) atau pemberian kondisi stress pada kumpulan sel somatik yang bersifat embriogenik.

Di China dan Korea kombinasi kultur *in vitro* dan mutagen fisik merupakan salah satu program yang diprioritaskan untuk dikembangkan (Yunchang dan Liang 1997; Yi 1997). Dilaporkan pula bahwa kombinasi kedua perlakuan tersebut lebih efektif dan efisien dibandingkan dengan perlakuan tunggal.

Melalui seleksi *in vitro* telah terbukti dapat dihasilkan varietas baru yang lebih tahan terhadap faktor biotik dan abiotik dengan sifatnya yang diwariskan (Van den Bulk 1991; Remotti *et al.* 1995)

Seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap kekeringan umumnya menggunakan polyethylene glycol (PEG) sebagai komponen seleksi. Penggunaan PEG dalam induksi stress air pada tanaman sudah dipakai sejak lama (Krizek 1985). Menurut Adkins *et al.* (1995) kemampuan PEG dalam mendeteksi sel/kalus sebagai penapis *in vitro*, yaitu dapat menyeleksi sel/kalus dan beregenerasi membentuk tanaman lengkap dengan tingkat toleransi yang lebih baik. Polyethylene glycol adalah senyawa yang stabil, non ionik, polimer

panjang yang larut dalam air dan dapat digunakan dalam sebaran berat molekul yang luas (Lawyer 1970). PEG dengan berat molekul lebih dari 4000 dapat menginduksi stress air pada tanaman dengan mengurangi potensial air pada larutan nutrisi tanpa menyebabkan keracunan (Lawyer 1970). Dengan sifat-sifat tersebut PEG digunakan untuk menginduksi stress air dalam kultur *in vitro*. Short *et al.* (1987) menyatakan bahwa dalam kultur *in vitro*, PEG dapat menginduksi stress air dan berkorelasi positif dengan yang terjadi di lapang atau rumah kaca. PEG dapat digunakan untuk mensimulasi cekaman kekeringan karena dapat menahan air sehingga tidak tersedia bagi sel somatik, kecuali sel somatik/kalus mempunyai mekanisme tertentu untuk menarik air.

Seleksi *in vitro* untuk mendapatkan sifat toleran terhadap cekaman kekeringan telah dilakukan antara lain pada tanaman *Vigna radiata* L. (Gulati dan Jaiwal 1993), *Brassica juncea* (Gangapadhyay *et al.* 1997), kentang (*Solanum tuberosum*), padi (*Oryza sativa* L.), *Sorghum bicolor* L. (Banzai *et al.* 1991; Adkin *et al.* 1995; Duncan *et al.* 1995), seledri (Cho dan Gong 1991), dan kacang tanah (Savin *et al.* 1991).

Salah satu faktor yang berkaitan dengan sifat fisiologi berkenaan dengan kemampuan tanaman untuk bertahan terhadap cekaman kekeringan adalah perubahan akumulasi prolin dalam jaringan (Bates 1975). Prolin disini berperan sebagai osmoregulator (Hever 1999). Tidak semua tanaman menunjukkan kandungan prolin yang tinggi bila menghadapi cekaman (Deb *et al.* 1996).

Pada tanaman Cerealia (Richard *et al.* 1987) menunjukkan adanya variasi kuantitatif akumulasi prolin untuk karakter fisiologi sebagai respon terhadap cekaman kekeringan, demikian pula pada tebu.

Seleksi *in vitro* untuk meningkatkan ketahanan sel terhadap Al telah digunakan pada tomat dan kentang (Stavarek dan Rains 1984) dan sorgum (Smith *et al.* 1983; Duncan *et al.* 1995). Komponen seleksi yang digunakan, yaitu Al dengan kondisi lingkungan media kemasaman yang rendah. Unsur Al dapat diberikan dalam bentuk $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ atau garam mineral lainnya.

Seleksi *In Vitro* untuk Toleransi terhadap Lahan Masam pada Tanaman Kedelai

Masalah yang sering dihadapi dalam seleksi *in vitro* adalah sulit beregenerasinya massa sel toleran Al dan pH rendah. Penelitian untuk regenerasi massa sel embriogenik setelah diseleksi pada kondisi Al berbeda dan pH rendah telah dilakukan di BB-Biogen, Bogor dengan menggunakan embrio zigotik muda dan varietas yang dapat beregenerasi melalui jalur embriogenesis somatis, yaitu Wilis, dan dua varietas toleran terhadap kemasaman tanah, yaitu Sindoro dan Slamet yang digunakan sebagai kontrol (Mariska *et al.* 1999; 2001; Sopandie *et al.* 1996; Jusuf *et al.* 1999). Embrio zigotik muda diisolasi dari polong muda umur 12-20 hari setelah penyerbukan. Sebelum ditanam embrio zigotik terlebih dahulu diradiasi dengan sinar gamma dosis 0 dan 400 rad untuk meningkatkan keragaman.

Setelah diradiasi, embrio zigotik muda dikulturkan pada media semi solid MS (Murashige dan Skoog 1962) dengan vitamin B5, dan diperkaya dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D konsentrasi tinggi serta dikombinasi dengan beberapa asam amino, sukrosa, dan

gel rite sebagai pematid. Metode yang digunakan untuk induksi kalus embriogenik berdasarkan hasil penelitian Mariska *et al.* (1999).

Seleksi massa sel embriogenik tanaman kedelai dilakukan dengan mengkulturkannya pada media seleksi dengan tahapan yang berbeda. Seleksi dilakukan pada media yang sama dengan media induksi kalus dengan penambahan $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (0, 100, 400, 300, dan 500 ppm) dan pH 4. Untuk memunculkan sifat toksisitas Al dan memunculkan mutan-mutan baru, media MS dimodifikasi dengan menggunakan $NH_4NO_3 = 2400$ mg/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O = 15$ mg/l, $KH_2PO_4 = 13$ mg/l, dan Fe yang digunakan ($FeSO_4 \cdot 7H_2O = 28$ mg/l) tidak dikelat oleh EDTA.

Benih somatik yang berhasil diregenerasikan dari sel yang toleran Al dan pH rendah kemudian diaklimatisasi atau diperbanyak terlebih dahulu secara *in vitro* untuk kegiatan selanjutnya. Pada media seleksi terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi Al maka semakin rendah daya regenerasi membentuk benih somatik (Tabel 1). Dengan radiasi tampaknya dapat memacu daya regenerasi kalus membentuk benih somatik. Untuk kontrol (tanpa radiasi) secara visual terlihat kalus yang terbentuk lebih besar dan pertumbuhannya sangat cepat sehingga menghambat perkembangan struktur embrio somatik.

Tabel 1. Jumlah benih somatik tiga varietas kedelai yang terbentuk pada media seleksi. Balitbio 2000.

Varietas/intensitas radiasi	Jumlah benih somatik pada konsentrasi Al (ppm)						Jumlah
	0	100	200	300	400	500	
Wilis							
Kontrol	12	10	7	4	6	7	46
400 rad	132	105	67	52	42	48	446
Sindoro							
Kontrol	10	9	6	8	7	6	46
400 rad	62	69	25	25	23	21	225
Slamet							
Kontrol	23	20	14	15	10	10	92
400 rad	14	9	13	10	6	8	60

Sumber: Mariska *et al.* (2001).

Tabel 2. Jumlah benih somatik tiga varietas kedelai setelah seleksi dengan kondisi Al berbeda pada media perkecambahan. Balitbio, 2000.

Varietas/intensitas radiasi	Jumlah benih somatik pada konsentrasi Al (ppm)						Jumlah
	0	100	200	300	400	500	
Wilis							
Kontrol	3	16	8	1	7	4	39
400 rad	9	15	24	12	6	3	69
Sindoro							
Kontrol	0	0	3	0	1	1	5
400 rad	5	4	9	17	11	9	55
Slamet							
Kontrol	7	15	4	7	4	7	44
400 rad	3	2	1	1	0	6	13

Sumber: Mariska *et al.* (2001).

Benih somatik yang terbentuk pada media seleksi kemudian disubkultur pada media perkecambahan (Tabel 2). Pada media tersebut terlihat adanya penurunan kemampuan regenerasi membentuk benih somatik yang strukturnya sempurna. Bahkan pada varietas Slamet benih somatik yang terbentuk pada umumnya tidak sempurna.

Dari hasil seleksi *in vitro* diperoleh 39 benih somatik yang telah diaklimatisasi. Dari penampakan visual biakan terlihat bahwa benih somatik Slamet tidak tumbuh secara normal, sehingga untuk varietas Slamet somatik yang diaklimatisasi mati semua. Dari ke-39 benih somatik tersebut hanya 12 yang dapat tumbuh sampai berproduksi, sedangkan sisanya mati sebelum berbunga. Banyak hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pada tanaman kedelai yang sering menjadi masalah pada regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik adalah pembentukan benih somatik yang tidak normal dan keberhasilan yang rendah dalam tahap aklimatisasi. Dari semua tanaman yang tumbuh di rumah kaca terdapat keragaman yang tinggi baik pada fase vegetatif maupun generatif. Biji yang dihasilkan dari ke-12 tanaman tersebut akan diuji kembali pada lahan masam.

Pengujian di Lahan Masam

Biji-biji yang dihasilkan oleh tanaman hasil seleksi *in vitro* tersebut kemudian ditanam di kamar kaca dengan menggunakan tanah masam yang diambil dari Gajrug Banten (Mariska 2002). Pengujian ini dibagi menjadi dua seri. Pada seri pertama diuji tiga genotipe, yaitu Wilis Radiasi AI-300 (A), Sindoro Radiasi AI-100 (H), dan Sindoro Radiasi pH 4 (1). Dipilihnya ketiga genotipe ini karena ketiganya memiliki jumlah polong yang cukup besar (<30 buah) dan tidak banyak menghasilkan polong berbiji 1. Pada percobaan seri pertama digunakan tanah yang memiliki pH 4,80, Al₂O₃ 11,57 me, dan kejenuhan Al 57%. Pada seri kedua ditanam sembilan genotipe yang tersisa. Tanah yang digunakan pada seri kedua memiliki pH 4,32, Al₂O₃ 13,32 me, dan kejenuhan Al 81% (Mariska 2002).

Dari hasil pengujian di rumah kaca terpilih genotipe Sindoro Radiasi AI-100 (H) pada pengujian seri pertama dan Wilis Radiasi AI-500 (E) pada pengujian seri kedua. Pemilihan kedua genotipe tersebut didasarkan pada penampilan visual dan potensi hasil dibandingkan terhadap varietas asalnya, yaitu Sindoro dan Wilis.

Karena keterbatasan dana dan lahan hanya genotipe Sindoro Radiasi AI-100 (H) yang diuji kembali di lapang. Genotipe ini dianggap lebih berpotensi dibandingkan Wilis Radiasi AI-500 (E) mengingat jumlah polong genotipe ini relatif banyak sejak masih generasi pertama. Pengujian dilakukan di Gajrug, Banten dengan pH 4,60, Al₂O₃ 12,6, dan kejenuhan Al 45,9%. Dari hasil pertanaman ini terdapat lima nomor yang tidak ditanam kembali karena jumlah polongnya jauh di bawah Sindoro sebagai kontrol.

Kondisi pertanaman di lahan masam ini sangat beragam, karena kondisi tanah yang tidak homogen. Pada tanah-tanah yang berwarna hitam, kondisi tanaman lebih baik karena tanah-tanah hitam ini memiliki pH yang lebih tinggi (4,93) dan kejenuhan Al yang rendah (16,19). Keragaman pada pertanaman di Gajrug juga terlihat dari nilai ragam Sindoro yang besar (1,7±1,2). Mengingat keragaman yang timbul di lahan masam Gajrug, pertanaman pada generasi keempat dilakukan di dua lokasi, yaitu di Gajrug dan Bogor. Lahan di Bogor memiliki pH 4,78, Al₂O₃ 1,49 me, dan kejenuhan Al 7,69%.

Untuk G2, kode N menunjukkan bahwa nomor tersebut ditanam di tanah normal (Aldd = 0) Data G2 merupakan data jumlah polong individu, sedangkan data G3 dan G4 merupakan data jumlah polong rata-rata. (Sumber: Mariska *et al.* 2004)

Penampilan tanaman di Bogor terlihat lebih baik dibandingkan dengan di Gajrug. Dari hasil pengujian di empat lokasi pada tiga generasi terlihat adanya nomor-nomor yang berpotensi memiliki ketahanan dan daya hasil yang lebih tinggi dibandingkan kontrol (Tabel 3). Dari hasil pengujian lahan masam terlihat adanya nomor-nomor yang secara konsisten memiliki hasil yang lebih baik dari Sindoro (Lampiran 1), hal ini berarti terdapat potensi yang cukup besar untuk mendapatkan galur-galur harapan yang toleran terhadap Al dan pH rendah.

Pada pertanaman generasi keempat di Gajrug diperoleh tiga tanaman yang lebih tinggi dibandingkan Sindoro (Tabel 3). Ketiga tanaman ini berasal dari satu nomor dan diduga merupakan hasil segregasi. Oleh sebab itu, ketiga tanaman tersebut digalurkan dan dijadikan nomor tersendiri.

Seleksi *In Vitro* untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan pada Tanaman Padi

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah padi Indica varietas IR64 yang merupakan padi sawah dan tidak tahan terhadap cekaman kekeringan tetapi berproduksi tinggi dan beradaptasi luas. Untuk induksi kalus digunakan embrio yang diisolasi dari biji matang dan ditanam pada media MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 3 g/l. Kalus kemudian diradiasi dengan sinar gamma 0, 300, 500, dan 700 rad. Setelah radiasi, kumpulan sel somatik diseleksi dengan PEG (BM 6000) pada beberapa taraf konsentrasi 0, 10, 15, dan 20% yang setara dengan tekanan osmotik 0, -0,03, -0,19, dan -0,41 Mpa (Mexal *et al.* 1975), 1 Mpa setara dengan 10 bar. Seleksi dilakukan selama 4 minggu dan setelah seleksi dilakukan regenerasi pada media MS + BA 1-3 mg/l, IAA 0,1 dan zeatin 1 mg/l.

Setelah regenerasi, benih hasil seleksi yang sudah diaklimatisasi kemudian diuji daya tembus akarnya, analisis kandungan prolin serta produksinya di rumah kaca.

Uji daya tembus akar dilakukan setelah somaklon generasi pertama berkecambah (hasil seleksi PEG 20%) kemudian ditanam pada pot plastik yang telah diisi campuran tanah : pupuk kandang : pasir = 1 : 1 : 1. Pada bagian dasar pot dilapisi campuran parafin : vaselin = 60% : 40% dengan ketebalan 3 mm dan tingkat kekerasan 12 bar. Dua hari setelah benih ditanam, pot plastik diletakkan di atas gelas plastik yang berisi larutan Yoshida.

Tabel 3. Data-data tanaman pilihan generasi keempat (G4) di Gajrug (Aldd 16,02; kejenuhan 45,98%; pH 4,67).

Peubah	I	II	III	Sindoro*
Tinggi tanaman	15	16	22	23/15,6
Polong total	37	28	54	30/6,6
Polong isi	35	22	54	19/4,6
Polong hampa	2	4	0	30/2,7

Sumber: Mariska *et al.* (2004).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada media regenerasi tidak semua kalus dapat melakukan diferensiasi, di samping itu warna kalusnya ada yang berwarna kuning dan kuning kecoklatan (Tabel 4). Warna kalus sebelum radiasi umumnya berwarna kuning tetapi setelah radiasi dan seleksi berubah menjadi kuning kecoklatan, dan kalus yang telah diberi perlakuan radiasi dan seleksi ada yang dapat beregenerasi membentuk tunas. Organ tersebut paling banyak terbentuk, yaitu 51 dari kalus yang diradiasi 500 rad tanpa diseleksi PEG. Dengan seleksi memakai PEG tampaknya menurunkan kemampuan kalus beregenerasi atau populasi sel somatik yang tahan terhadap PEG memang rendah (Tabel 5).

Setelah terbentuk akar pada tunas hasil seleksi dan radiasi kemudian dilakukan aklimatisasi dan selanjutnya biji generasi pertama diuji daya tembus akarnya, seleksi dini dengan PEG, dianalisis kandungan prolina sampai ke produksinya.

Karakter tersebut umumnya digunakan untuk menguji daya toleransi tanaman terhadap kekeringan. Dengan uji PEG 20%, biji dari IR64 tidak dapat berkecambah tetapi untuk somaklon (ada 17 somaklon) lainnya dapat berkecambah. Hasil penelitian Bouslama dan Shcapaugh (1984) menunjukkan bahwa benih yang cepat berkecambah pada larutan PEG mampu menghasilkan akar lebih cepat dan perakaran yang dihasilkan lebih baik. Selain itu, dari hasil penelitian Nemoto *et al.* (1995), Khush (1995), Redona dan Mackill (1996) menunjukkan bahwa tanaman yang mampu tumbuh baik pada media yang mengandung PEG 20% mempunyai korelasi positif dengan toleransi kekeringan di lapangan. Benih somaklon kemu-

Tabel 4. Warna kalus hasil seleksi *in vitro* pada media regenerasi, minggu kedua setelah tanam.

Perlakuan radiasi (rad) dan seleksi dengan PEG	Warna kalus
IR64	
0 rad (0% PEG)	Kuning
0 rad (10 dan 15% PEG)	Kuning kecoklatan
300 rad (0% PEG)	Kuning
300 rad (10 dan 15% PEG)	Kuning kecoklatan
500 rad (0% PEG)	Kuning
500 rad (10 dan 15% PEG)	Kuning kecoklatan
700 rad (0% PEG)	Kuning
700 rad (10 dan 15% PEG)	Kuning kecoklatan

Sumber: Lestari (2005).

Tabel 5. Jumlah tunas asal kalus yang didapatkan dari hasil induksi mutasi dan seleksi *in vitro*.

Perlakuan radiasi (rad) dan seleksi dengan PEG (%)	Jumlah kalus yang diregenerasikan	Jumlah tunas
IR64		
300 rad (0% PEG)	20	2
0 rad (20% PEG)	20	7
0 rad (15% PEG)	20	6
500 rad (0% PEG)	30	51
700 rad (0% PEG)	10	7

0 rad (20% PEG) = kalus tidak diradiasi dan diseleksi menggunakan PEG 20%.

Sumber: Lestari (2005).

dian diuji daya tembus akarnya dan terlihat bahwa ada somaklon (12 somaklon) yang dengan cepat menembus lapisan parafin : vaselin, di samping itu akarnya lebih tebal dan lebih panjang. Seleksi untuk tujuan pemuliaan dengan cara menghubungkan antara sifat perakaran dengan ketahanan terhadap kekeringan telah dilakukan oleh Chay (1972), akar yang dihasilkan lebih tebal, panjang, dan banyak (Ekanayake *et al.* 1985). Dari hasil analisis kandungan prolin terlihat bahwa untuk kontrol (IR64) kandungannya rendah, yaitu 17,07 nmol/g, tetapi untuk somaklon jauh lebih tinggi antara 113,6-287,2 nmol/g.

Dari ketiga karakter tersebut terlihat adanya korelasi positif dari somaklon yang diuji. Kandungan prolin paling tinggi berasal dari ScIR@4.2, yaitu 267,2 nmol/g. Pada somaklon tersebut setelah diuji dengan PEG 20% benihnya dapat berkecambah kemudian akarnya dapat menembus lapisan parafin : vaselin. Bahkan untuk persentase gabah isi/malai cukup tinggi, yaitu 53 dan penurunan gabah isi dalam kondisi cekaman kekeringan dibandingkan kondisi normal rendah, yaitu 29%. Dengan adanya korelasi berbagai karakter yang telah diuji menunjukkan adanya sifat poligenik pada tanaman yang toleran terhadap kekeringan. Pada umumnya tanaman yang mengalami cekaman kekeringan akan menggunakan lebih baik dari satu mekanisme untuk mempertahankan diri (Nitla 2001). Mekanisme resistensi ketahanan terhadap cekaman kekeringan merupakan hasil interaksi dari beberapa gen yang mengendalikan karakter morfologi, fisiologi, dan biokimia pada saat tanaman menjalani cekaman kekeringan (Ekanayake *et al.* 1985). Dengan demikian, dari hasil pengujian pada berbagai karakter terlihat bahwa somaklon ScIR@3, ScIR@3.2, ScIR@4.1, ScIR@4.2, ScIR@7.1, ScIR@7.2, ScIR@11, dan ScIR@18 merupakan nomor-nomor yang konsisten pada karakter yang diuji dan memberikan potensi yang cukup besar untuk mendapatkan galur-galur harapan yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Kesimpulan

Seleksi *in vitro* kombinasi dengan mutagen fisik dapat digunakan untuk meningkatkan toleransi tanaman kedelai terhadap cekaman Al dan pH rendah (lahan masam) serta tanaman padi terhadap cekaman kekeringan.

Pengujian di lapang (lahan masam) sampai generasi keempat menghasilkan beberapa nomor kedelai yang memiliki ketahanan lebih baik terhadap Al dan pH rendah dibandingkan varietas toleran. Demikian pula untuk tanaman padi sampai generasi kedua menghasilkan beberapa nomor yang memiliki ketahanan lebih baik terhadap cekaman kekeringan dibandingkan tanaman induknya (varietas IR64).

Terdapat korelasi antara kemampuan berkecambah pada media dengan PEG, daya tembus akar dan kandungan prolin yang tinggi dengan sifat toleran pada kondisi cekaman kekeringan pada padi.

Bahan Bacaan

- Adisarwanto, B., B. Santoso, R. Marwoto, K. Astanto, N. Saleh, A. Harsono, dan Sumarno. 1995.** Prospek pengembangan kedelai di Nusa Tenggara Timur. Edisi Khusus Balitkabi 3:107-120.
- Adkins, S.W., R. Kunanu Vatchaidah, and I.D. Godwin. 1995.** Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters. *Aust. J. Bot.* 43:201-109.

- Ahloowalia, B.S. 1986.** Limitation to the use of somaclonal variation in crop improvement. *In Semal (Ed.). Somaclonal Variation and Crop Improvement.* Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. p. 15-27.
- Amberger, L.A., R.G. Palmer, and R.C. Shoemaker. 1992.** Analysis of culture induced variation in soybean. *Crop Sci.* 32:1103-1108.
- Bates, L.S., R.P. Walden, and I.D. Teare. 1975.** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Banzai, K.C., N.P. Shantha-Nagorojan, Sukamoran, and S. Nagarajan. 1991.** A rapid screening technique for drought resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research* 34:241-248.
- Cho, H.J. and W.Y. Yong. 1991.** Effect of PEG and ABA on storage starch accumulation and the survival of desiccated somatic embryos of. *Rural Dev. Admin-Biotechnology. Ros. Rep.* 33(3):13-20.
- Daud, M.E. 1996.** Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 24:159-186.
- Deb, N., B. Alam; S.D. Gupta, and B.C. Ghosh. 1996.** Cell membrane stability of leaf tissue and its relationship with drought tolerance in arachis. *Indian J. Exp. Biol.* 34:1044.
- Doss, B.D., R.W. Pearson, and H.T. Rogers. 1974.** Effect of soil water stress at various growth stages on soybean, bean and sunflower. *Crop Sci.* 11:403-407.
- Duncan, R.R., R.M. Waskom, and M.W. Nahors. 1955.** *In vitro* screening and field evaluation of tissue culture regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. *Euphytica* 85:371-380.
- Ekanayake, I.J. Garrity, D.P. Masayo, and J.L. O'Toole. 1985.** Root pulling resistance and association with drought tolerance. *Euphytica* 43:903-913.
- Evans, D. A. and W. R. Sharp. 1986.** Somaclonal and clonal. *In Evans et al. (Eds.). Handbook of plant cell culture* 4:87-132.
- Gangapadhyay, G., S. Basu and S. Gupta. 1997.** *In vitro* selection and physiology caharcterization of NaCl and mannitol adapted callus lives in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:164-169.
- Gulati, A., and P.K. Jaiwal. 1993.** Selection and characterization of mannitol-tolerant callus lines of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34:35-41.
- Hawbeker, M.S., W.R. Fehr, L.M. Mansur, R.C. Shoemaker, and R.G. Palmer. 1993.** Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. *Theor. App. Genet.* 87:49-53.
- Hever. 1999.** Osmoregulatory role of proline in plant exposed to environmental stress, *In Perssarakli (Ed.). Handbook of Plant and Crop Stress. Second Edition, Revised and Expanded* 675-695.
- Hidayat, A. dan A. Mulyani. 2002.** Lahan kering untuk pertanian. *Dalam Mappaona et al. (Eds.). Buku Pengelolaan Lahan Kering untuk Meningkatkan Produksi Pertanian Berkelanjutan.* Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanah dan Agroklimat, Bogor.
- Jusuf, M., D. Sopandie, and Suharsono. 1999.** Molecular biology of soybean tolerance to aluminum stress. Graduate Team Research. URGE. DHGE.
- Khosh, G.S. 2000.** Taxonomy and origin of rice. *In Singh, R.K., U.S. Sing, and G.S. Khos. (Eds.). Aromatic Rices.* New Delhi. Calcutta. Oxford and IBH. Pub.

- Krizek, D.T. 1985.** Methods of inducing water stress in plant. Hort. Sci. 20:1028-1038.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcraft. 1981.** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:97-214.
- Lawyer, D.W. 1970.** Absorption of polyethylene glycol by plants either effect on plant growth. New Physiol. 69:501-513.
- Lestari, E.G. 2005.** Seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap kekeringan pada tanaman padi. Thesis S3. Pascasarjana, IPB.
- Mariska, I., S. Hutami, M. Kosmiatin, A. Husni, W.H. Adil, dan Y. Supriati. 1999.** Regenerasi dan seleksi *in vitro* untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap aluminium pada tanaman kedelai. Laporan Hasil Penelitian Tahun 2000. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Mariska, I., S. Hutami, M. Kosmiatin, A. Husni, W.H. Adil, and Y. Supriati. 2001.** Somatic embryogenesis in different soybean varieties. In Sunarlim, N., M. Machmud, W.H. Adil, F. Salim, and I.N. Orhani (Eds.). Proceedings of Workshop on Soybean Biotechnology for Aluminium Tolerance on Acid Soils and Disease Resistance. Central Research Institute for Food Crops, Bogor.
- Mariska, I. 2002.** Peningkatan ketahanan terhadap aluminium pada pertanaman kedelai melalui kultur *in vitro*. Laporan Kemajuan RUT VIII.1. Tahap I. Kementrian Riset dan Teknologi dan LIPI. Jakarta.
- Mariska, I., E. Syamsudin, D. Sopandie, S. Hutami, A. Husni, M. Kosmiatin, dan A. Vivi. 2004.** Peningkatan ketahanan tanaman kedelai terhadap aluminium melalui kultur *in vitro*. Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian 23(2):46-52.
- Mulyani, A., Hikmatullah, dan H. Subagyo. 2003.** Karakteristik dan potensi tanah masam lahan kering di Indonesia. Makalah Utama. Dalam Simposium Nasional Pendayagunaan Tanah Masam. Balai Penelitian Tanah. Puslitbang Tanah dan Agroklimat. Bandar Lampung, 29-30 September 2003.
- Nemoto, K., S. Novita, and T. Bada. 1995.** Shoot and root development in rice related to the Phylocrom. Crop Sci. 35:24-99.
- Price, A. and B. Courtois. 1999.** Mapping QTLs associated with drought resistance in rice. Progress, Problem and Prospect.
- Redona, E.D. and D.J. Mackill. 1996.** Genetic variation for seedling viga traits in rice. Crop Sci 36:285-290.
- Remotti, P.C., H.J.M. Loffer, and L. Van Vloten-Doting. 1995.** Selection of cell lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from Gladiolus grandiflorus CV. Peter Pears.
- Richard, R.A., C.W. Denett, C.O. Qualset, E. Edstein, J.D. Norlyn, and M.D. Winslow. 1987.** Variation in yield of grain and biomass in wheat, barley and tricale in a salt-affected fuclid. Field Crops Res. 15:277.
- Savin, N.B., A. Gupta, S. Prakhas, and B. Biswas. 1991.** Isolation and characterization of a salt tolerant lines of *Arachis hypogea* L. using *in vitro* culture. Acta Hort. 289:219-222.
- Short, K.C., I. Warburton, and A.V. Roberts. 1987.** *In vitro* hardening of cultures cauliflower and chrysantemum planlets to humidity. Acta Hort. 2120:329-324.

- Smith, R.H., S. Bhaskaran, and K. Scherz. 1983.** Sorghum plant regeneration from aluminium selection media. *Plant Cell Rep.* 2:129-132.
- Sopandie, D., M. Jusuf, Supriyatno, dan Hanum. 1996.** Fisiologi dan genetik daya adaptasi kedelai terhadap cekaman kekeringan, pH rendah dan aluminium tinggi. Laporan Akhir RUT. Dewan Riset Nasional. Kementrian Riset dan Teknologi. Jakarta.
- Specht, J.E. and G.L. Graef. 1996.** Limitation and potentials of genetic manipulation of soybean. *In* Verna, D.P.S. and R.C. Shoemaker. (Ed.). *Soybean: Genetic Molecular Biology and Biotechnology*. CAP International, Walling Ford.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984.** The development of tolerance cells to mineral stress. *Hort. Sci.* 19:377-382.
- Suardi, D. 1994.** Evaluasi penelitian ketahanan tanaman padi terhadap kekeringan. *Bullittan* 9:8.
- Van den Bulk, R.U. 1991.** Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding, a review. *Euphytica* 56:269-285.
- Widoretno dan Wahyu. 2003.** Seleksi *in vitro* untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) dan karakterisasi varian somaklonal yang toleran. Thesis. Pascasarjana, IPB. 136 hlm.
- Yi, Le. 1997.** Development of genetic resources by *in vitro* application of radiation. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA, STA, Most and JAIF. 12-18 Oct. Suwon, Korea.
- Yunchang, Li and Qu Liang. 1997.** A review and prospect on mutation breeding of oil crops in China. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA, STA, Most, and JAIF. 12-18 Oct. Suwon, Korea.

Lampiran 1. Pengurutan jumlah polong di tiga lokasi pertanaman pada tiga generasi.

Genotipe	G2	Genotipe	G3	Genotipe	G4	Genotipe	G4
H2-11N	112,0	H2-10	19,5	H2-13	55,5	H2-22	9,2
H2-34N	111,0	H3-7	19,2	H2-21	46,6	H2-5	8,4
H2-6N	106,0	H11-1	18,5	H2-13	46,0	H2-11N	7,9
H2-22N	98,0	H2-8N	17,0	H2-18	44,7	H1-13	7,6
H2-29N	95,0	H1-5	16,0	H2-23	44,1	H1-5	7,4
H2-12N	93,0	H1-15	15,5	H2-9	43,4	H2-3	6,7
Sindoro N	87,4	H1-3	14,9	H2-35	42,0	H2-25	6,6
H2-25N	81,0	H2-3	12,3	H2-6	41,9	H1-1	6,3
H2-10N	78,0	H2-7	11,6	H2-14N	41,9	H2-1	5,8
H2-9N	75,0	H2-17	11,3	H2-22	41,4	H2-26N	5,8
H3-9	65,0	H2-29N	11,0	H2-37	41,0	H2-10	5,7
H2-14N	59,0	H2-18	10,6	H2,6	40,8	H2-36	5,5
H2-21	57,0	H2-38N	10,4	H2-34N	40,6	H2,23N	5,4
H2-8N	57,0	H2-11	9,9	H2-12N	39,3	H2-9N	5,3
H2-15N	51,0	H2-23N	9,6	H3-6	39,1	H2-29N	5,3
H1-1-0	50,0	H2-26	9,5	H1-13	39,1	H2-22N	5,0
H2-23N	50,0	H2-26N	9,5	H2-4	38,5	IH2-3	4,9
H3-9	50,0	H2-12	9,4	H2-1	38,5	H2-18	4,8
H2-35	49,0	H2-3	8,5	H2-36	38,2	H2-5N	4,6
H2-13N	49,0	H2-28	8,3	H2-8	38,0	Sindoro	4,6
H2-38N	48,0	H2-38N	8,3	H3,9	37,3	H1-3	4,2
H3-6	48,0	H2-15	8,2	H2-26	36,5	H2-14	3,8
H2-17	46,0	H3-2	8,2	H2-12	36,3	H3-7	3,8
H2-10N	45,0	H2-14	8,1	H2-28	36,0	H2-28	3,7
H2-31	45,0	H2-36	8,0	H2-17	35,2	H2-27N	3,6
H2-1 8	44,0	H2-21	7,9	H2-6N	35-1	H2-38N	2,4
H2-1	43,0	H2-22N	7-8	H2-23N	34,9	H2-15	2,3
H2-14	43,0	H2,27	7,7	H3,2	34,9	H2-12	2,2
H2-5	43,0	H1-4	7,6	H2-32	34,7	H2-7	2,1
H2-13	43,0	H2-13	7,6	H2-16N	34,6	H2-26N	2,0
H2-30	42,0	H3-9	7,6	H1-4	34,5	H2-38	1,6
H2-37	42,0	H3-9	7,6	H2-34	34,1	H2-6N	1,4
H3-2	42,0	H2-22	7,5	H2-9N	34,0	H2-21	0,8
H1-16	41,0	H1-11	7,2	H2-3	33,6	H2-20N	0,7
H2-3	41,0	H2-15N	7,2	H1-16	33,4		
H2-32	38,0	H2-11N	5,7	H2-11N	32,7		
H1-11	37,0	H2-23N	5,7	H2-20	32,1		
H2-16	37,0	H2-4	5,6	H2-22N	32,3		
H2-18	37,0	H2-9N	5,6	Sindoro	31,9		
H2-9N	37,0	H1-16	5,2	H1-15	31,1		
H3-4	37,0	H2-34N	5,2	H2-18	31,6		
H1-4	36,0	H2-21	5,1	H2-31	31,5		
H2-26N	36,0	H2-35	5,1	H2-10N	31,4		
H2-27	36,0	H2-6N	5,1	H2-25N	30,9		
Sindoro	35,7	H3-6	5,f	H2-10	30,8		
H1-3	35,0	H2-37	5,0	H3-9	X8		
H1-5	35,0	H2-34	4,9	H1-5	30,3		
H2-34	35,0	H2-24	4,6	H2-21	29,2		
H2-26N	34,0	H3-8	4,5	H2,6	29,0		
H2-23	33,0	H2-2SN	4,4	H3-4	28,9		
H2-28	33,0	H3-9	4,3	H2-16	28,8		
H2-11	32,0	H2-13	4,1	H1-3	28,7		
H2-13	32,0	H2-12N	4,0	H3-3	28,7		
H1-1	31,0	H2-32	4,0	H2-7	27,7		

Lampiran 1. Lanjutan.

Genotipe	G2	Genotipe	G3	Genotipe	G4	Genotipe	G4
H2-12	31,0	H2-8	3,9	H2-15	27,6		
H2-21	31,0	H2-35	3,8	H2-26	27,4		
M2-25	31,0	H3-4	3,7	H3-9	26,9		
H2-15	30,0	H2-10N	3,5	H1-11	26,6		
H2-36	30,0	H2-14N	3,5	H2-38N	26,2		
H2-6	30,0	H2-18	3,5	H2-26N	26,1		
H3-8	29,0	H2-30	3,5	H2-38	26,1		
H2-24	28,0	H2-30	3,1	H3-7	24,2		
H1-15	27,0	H2-1	3,0	HUN	24,1		
H3-7	27,0	H2-31	3,0	H2-11	21,6		
H2-4	25,0	H2-13N	3,0	H2-36	19,7		
H2-8	23,0	Sindoro	1,7	H2-30	17,8		
H2-38	11,0						

G2 = kamar kaca (pH 4,8, Aldd 11,57, kejenuhan AI 57%), G3 = Gajrug 1 (pH 4,67, Aldd 16,02, kejenuhan AI 45,98%), G4 = Bogor (pH 4,78, Aldd 1,49, kejenuhan AI 7,69%), G4 = Gajrug 2 (pH 4,67, Aldd 16,02, kejenuhan AI 45,98%), G5 & G6 = Desa Bagoang, Jasinga (pH 4,72, Aldd 1,69 me, kejenuhan AI 11,43%),