

# Penyelamatan Embrio Hasil Persilangan Kacang Hijau dengan Kerabat Liarnya

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

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

## ABSTRAK

Kacang hijau (*Vigna radiata* L. Wilczek) mempunyai prospek yang baik untuk dikembangkan antara lain di lahan kering. Dari berbagai penyakit yang banyak menyerang pertanaman kacang hijau terdapat tujuh jenis penyakit penting antara lain penyakit kudis yang disebabkan oleh cendawan *Elsinoe iwatae*. Sampai saat ini, belum ada varietas unggul kacang hijau tahan penyakit kudis. Sifat tahan terhadap penyakit kudis terdapat pada kerabat liarnya, kacang hitam (*Vigna mungo* (L) Hepper). Namun demikian, persilangan antara keduanya terdapat inkompatibilitas. Persilangan antara *V. radiata* dan *V. mungo* menghasilkan biji yang morfologinya tidak normal, persentase perkecambahan biji yang rendah serta F1 yang diperoleh selalu steril. Untuk meningkatkan keberhasilan perkecambahan dan fertilitas tanaman F1 maka dilakukan penyelamatan embrio pada tingkatan umur yang lebih dini, serta penggantian kromosom pada biakan F1. Kultur *in vitro* telah banyak dimanfaatkan untuk menyelamatkan embrio atau biji hasil persilangan seksual dengan cara mengkulturkannya pada medium tumbuh. Pada penelitian ini empat varietas kacang hijau ditanam di rumah kaca, yaitu varietas Walet sebagai *Vigna radiata*, sedangkan *Vigna mungo* ada tiga jenis, yaitu VR-34, VR-35, dan No. 19/1. Perlakuan yang diuji ada tiga, yaitu (1) tetua betina kacang hitam, (2) umur biji muda setelah persilangan, dan (3) formulasi medium. Setelah tanaman berbunga dilakukan persilangan antara *V. radiata* dan *V. mungo* maupun resiprokalnya. Dari polong yang terbentuk setelah umur 1, 2, dan 3 minggu setelah persilangan embrionya dikulturkan secara *in vitro* pada beberapa medium, yaitu (1) MS + kinetin 0,2 mg/l + IAA 1 mg/l + kasein hidrolisat 0,5 g/l; (2) Knudson; (3) Knudson C; (4) Knudson + BA 1 mg/l; (5) Knudson C + BA 1 mg/l. Parameter yang diamati, yaitu persentase keberhasilan persilangan embrio/biji muda yang berkecambah, jumlah tunas dan penampilan biakan secara visual. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase keberhasilan tertinggi didapatkan pada persilangan antara kacang hijau varietas Walet dengan kacang hitam No. 19/1. Keberhasilan perkecambahan embrio hasil persilangan dengan kacang hijau sebagai tetua betina akan meningkat dengan meningkatnya umur embrio. Embrio dapat berkecambah pada seluruh medium dasar yang digunakan dan akan meningkat apabila ditambahkan BA 1 mg/l. Sampai akhir pengamatan embrio hasil persilangan dengan tetua betina kacang hitam belum dapat berkecambah.

**Kata kunci:** Kacang hijau, penyelamatan embrio, persilangan

## ABSTRACT

Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) have good prospect to develop in dry land. Scab is one of 7 kinds important diseases of mungbean plant caused by *Elsinoe iwatae*. The disease attack in wet season caused decreasing yield up to 60%. Until now there was no mungbean variety tolerant to Scab. The tolerant character found in the wild species (*Vigna mungo* L. Hepper). There was incompatibility in crossing between mungbean and the wild species (*V. radiata* x *V. mungo*). It caused abnormal seed, low germination percentage, and F1 sterile. Embryo rescue at early stage and multiply chromosome at F1 generation is one of the methods to solve the

problem. *In vitro* culture used to rescue the embryo or seed from crossing by cultured in growth medium. In this experiment 4 mungbean varieties (Walet as *V. radiata* and VR-34, VR-45, No. 19/1 as *V. mungo*) were planted in green house. Complete Randomized Design with Factorial was used in this experiment. The treatment were two factors (A) age of young seed (1, 2, and 3 weeks after pollination) and (B) formulation medium (1) MS + kinetin 0.2 mg/l + IAA 1 mg/l + casein hidrolisat 0.5 g/l; (2) Knudson; (3) Knudson C; (4) Knudson + BA 1 mg/l; (5) Knudson C + BA 1 mg/l. Cross-pollination was done between *V. radiata* and *V. mungo* with their reciprocal. After pollination the young seeds were cultured on treatment medium. Observation was done on percentage of young embryo/seed seedling, number of bud and visually observation of culture. The result showed that the highest percentage of cross-pollination was crossing between Walet and No. 19/1. Seedling of embryo from cross-pollination with Walet as female parent increased with increasing age of embryo. Embryo developed at all treatment medium and increased with addition of BA 1 mg/l. Embryo with *Vigna mungo* as female parent could not develop until the end of the experiment.

**Key words:** Mungbean, embryo rescue, cross-pollination

## PENDAHULUAN

Kacang hijau (*Vigna radiata* L. Wilczek) sudah dikenal masyarakat sebagai kacang-kacangan yang kaya akan zat gizi dan memiliki daya cerna yang baik, sehingga cocok sebagai gizi anak balita dan manula. Di samping itu, kacang hijau juga mempunyai prospek yang baik untuk dikembangkan antara lain di lahan kering. Dari berbagai penyakit yang banyak didapatkan menyerang pertanaman kacang hijau terdapat tujuh jenis penyakit penting antara lain penyakit kudis (Budiman dan Mukhlis, 1994) yang disebabkan oleh cendawan *Elsinoe iwatae*. Cendawan ini menyerang tanaman kacang hijau pada bagian daun, tangkai daun, batang, dan polong (Amir, 1978). Penyakit ini menyerang terutama pada musim hujan dan menyebabkan kehilangan hasil yang serius, sampai mencapai 60%.

Menurut Astanto dan Sutarman (1993) belum ada varietas unggul kacang hijau yang dilepas tahan terhadap penyakit kudis. Sifat tahan terhadap penyakit kudis terdapat pada kerabat liarnya, kacang hitam (*Vigna mungo* (L) Hepper). Sumber ketahanan telah teridentifikasi dalam plasma nutfah kacang hijau dan kerabat-kerabatnya. Kacang hitam, di antara jenis-jenis *Vigna* Asia, menunjukkan jenis yang paling memberikan harapan untuk persilangan antarjenis dengan kacang hijau (Arora dan Mauria, 1993). Namun demikian, persilangan antara kedua-nya terdapat inkompatibilitas dan secara kemitoksonomi memberi bukti bahwa terdapat perbedaan pada tingkatan spesies. Hal ini menjadi jelas bahwa *V. radiata* dan *V. mungo* merupakan dua spesies yang berbeda.

Persilangan antara *V. radiata* dan *V. mungo* menghasilkan biji yang morfologinya tidak normal. Beberapa biji kulit bijinya pecah dengan kotiledon merekah keluar, beberapa yang lainnya pengisian biji tidak penuh (Miyazaki *et al.*, 1984). Sering terjadi pula biji telah pecah dalam polong walaupun umur polong masih muda. Upaya penyelamatan biji secara konvensional, yaitu

dengan pengecambah-an pada petridish telah dilakukan di Inlitbio Muara tetapi tidak memberikan hasil yang berarti. Masih banyak kegagalan dalam upaya pengecambahannya, beberapa hal seperti berkurangnya vigor biji karena kerusakan pada kotiledon, serta serang-an jamur dan bakteri. Persilangan seksual menghasilkan biji yang persentase per-kecambahannya masih rendah serta F1 yang diperoleh selalu steril. Untuk mening-katkan keberhasilan perkecambahan dan fertilitas tanaman F1 maka dilakukan penyelamatan embrio pada tingkatan umur yang lebih dini, serta penggandaan kromosom pada biakan F1. Masalah inkompatibilitas seksual dan sterilitas pada hibridnya sering dijumpai pada persilangan antara dua tetua yang hubungan keke-rabatannya jauh (Ching dan Zanetini, 1996; Louzada dan Grosser, 1996). Kultur *in vitro* telah banyak dimanfaatkan untuk menyelamatkan embrio atau biji hasil persi-langan seksual dengan cara mengkulturkannya pada medium tumbuh (Raghavan, 1986). Pada tanaman kedelai, metode tersebut telah lama digunakan di antaranya untuk *Glicine max* dengan *G. tomentella* (Newell dan Hymowitz, 1978), *G. max* de-ngan *G. Clandsetina* (Singh *et al.*, 1987). Mariska *et al.* (1997) menggunakan kultur *in vitro* untuk menumbuhkan biji muda hasil persilangan panili budi daya (*Vanilla planifolia*) dengan panili liar (*V. albida*). Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya pengaruh beberapa faktor terhadap keberhasilan antara lain formulasi medium dan umur biji muda atau embrio setelah persilangan.

Dalam pemuliaan tanaman konvensional, banyak ditemui kegagalan dalam pembentukan embrio yang baik. Kegagalan disebabkan oleh hambatan pada poli-nasi, pertumbuhan pollen tube, fertilisasi, dan perkembangan embrio atau endos-perma. Perkembangan embrio dalam biji secara *in vitro* menurut para ahli embrio-logi merupakan proses embriogenesis, sedangkan menurut ahli fisiologi dan bio-kimia merupakan proses berurutan dari proses pembentukan zigot ke proses perkecambahan (Dure, 1975). Menurut Pierik (1978) kultur embrio pada prinsipnya dapat digolongkan menjadi dua macam, yakni kultur embrio muda (*immature embyo culture*) dan kultur embrio dewasa (*mature embryo culture*).

Tujuan jangka pendek dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan tunas *in vitro* hasil persilangan kacang hijau dengan kerabat liarnya, sedangkan tujuan jang-ka panjangnya untuk mendapatkan nomor-nomor baru kacang hijau yang toleran terhadap penyakit kudis.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Kelti Reproduksi dan Pertumbuhan (2002). Kacang hijau (*V. radiata*) yang ditanam di rumah kaca adalah varietas Walet yang banyak ditanam petani, sedangkan tiga jenis *V. mungo* yang ditanam, yaitu VR-34, VR-35, dan No. 19/1. Perlakuan yang diuji ada 2 faktor, yaitu (1) umur biji muda setelah persilangan dan (2) formulasi medium.

Setelah tanaman berbunga dilakukan persilangan antara *V. radiata* dan *V. mungo* yang dilakukan secara resiprokal. Kastrasi dilakukan pada sore hari sekitar pukul 16.00 wib sebelum bunga mekar. Fertilisasinya dilakukan pada keesokan harinya sekitar pukul 07.00 WIB. Dari polong yang terbentuk setelah umur 1, 2, dan 3 minggu setelah persilangan, embrionya dikulturkan secara *in vitro* pada beber-apa medium (1) MS + kinetin 0,2 mg/l + IAA 1 mg/l + kasein hidrolisat 0,5 g/l; (2) Knudson; (3) Knudson C; (4) Knudson + BA 1 mg/l; (5) Knudson C + BA 1 mg/l).

Medium yang digunakan adalah medium padat dengan penambahan agar swallow 7,5 g/l. Kemasaman medium dibuat  $\pm 5,7$  dengan KOH atau NaOH (1 N). Biakan diinkubasi ruang kultur dengan suhu  $\pm 24^{\circ}\text{C}$  dan diberi cahaya dengan intensitas  $\pm 800$  lux selama 16 jam sehari.

Parameter yang diamati, yaitu persentase keberhasilan persilangan, persen-tase pembentukan polong setelah persilangan, embrio/biji muda yang berkecam-bah, dan waktu perkecambahan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan tiga varietas dari kerabat liar kacang hijau ditujukan untuk melihat varietas mana yang lebih mudah disilangkan secara resiprokal yang dapat menghasilkan biji yang dapat berkecambah dan *fertil*, selain itu bertujuan untuk meningkatkan keragaman F1 yang dihasilkan dan diharapkan variasi yang tinggi terutama untuk sifat ketahanan terhadap penyakit *scab* (kudis).

Dari hasil persilangan diperoleh data keberhasilan persilangan resiprokal antara kacang hijau varietas walet dengan kacang hitam varietas VR-34, VR-35, dan No. 19-1, seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa keberhasilan persilangan umumnya masih rendah. Hal ini ditunjukkan dengan keberhasilan pembentukan polong yang dapat di-panen persentasenya masih rendah. Keberhasilan pembentukan polong tertinggi (49,57%) diperoleh dari persilangan antara kacang hijau (Walet) sebagai tetua be-tina dengan kacang hitam varietas No. 19/1 sebagai tetua jantan. Apabila dilihat da-ri jumlah polong yang terbentuk, persilangan

**Tabel 1.** Persentase keberhasilan persilangan kacang hijau dan kacang hitam

Persilangan Seksual (♀ x ♂)	Jumlah polinasi	Jumlah keberhasilan polinasi	Jumlah pembentukan polong	Persentase pembentukan polong
Walet x V-35	96	80	19	19,79
V-35 x Walet	94	36	18	19,15
Walet x V-34	54	37	16	29,63
V-34 x Walet	58	19	8	13,79
Walet x No.19-1	117	85	58	49,57
No. 19-1 x Walet	105	36	30	28,57

Walet = kacang hijau; VR-35, VR-34, dan No. 19/1 = kacang hitam; \* = kualitas biji kurang baik

ini tidak memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan kombinasi lainnya bahkan pembentukan biji hampanya paling banyak di dalam setiap polong. Pembentukan polong yang paling baik terdapat pada persilangan Walet dengan VR-35 di mana polong yang terbentuk penampilannya seperti kacang hijau baik bentuk maupun panjangnya, begitu juga dengan biji hampa yang dihasilkan hanya sedikit bahkan tidak ada. Untuk menghasilkan biji yang lebih banyak, persilangan ini diulang dan ternyata memberikan hasil yang sama seperti pada persilangan sebelumnya.

Dari hasil persilangan resiprokal terlihat bahwa pembentukan polong akan mengikuti tetua betina yang digunakan. Apabila digunakan tetua betina kacang hijau, maka polong yang terbentuk penampakannya seperti kacang hijau, meskipun tidak sepanjang kacang hijau tetapi permukaan polongnya tidak berbulu. Apabila kacang hitam yang digunakan sebagai tetua betina maka polong yang terbentuk penampilannya seperti kacang hitam di mana seluruh permukaan polong ditumbuhi bulu.

Pembentukan polong hasil persilangan antara Walet dan VR-35, merupakan polong paling baik dengan penampilan buah yang paling bernas, panjangnya hampir seperti Walet dengan biji hampa paling sedikit atau tidak ada biji hampa dibandingkan dengan polong hasil persilangan yang lain. Tetapi persilangan Walet dengan VR-35 sulit dilakukan di mana persentase terbentuknya polong hanya 19,79%, tetapi keberhasilan resiproknya tergolong tinggi (19,15%).

Dari hasil penelitian ini juga terlihat bahwa keberhasilan persilangan resiprokal apabila kacang hitam digunakan sebagai tetua betina selalu lebih rendah. Hasil ini sesuai dengan Jaiwal dan Gulati (1995) yang menyatakan bahwa persilangan kacang hijau dengan menggunakan tetua betina dari varietas liar sering memberikan hasil dengan persentase keberhasilan yang rendah atau bahkan terjadi kegagalan persilangan. Pada penelitian ini ketiga varietas liar yang digunakan dapat disilangkan meskipun dengan keberhasilan yang rendah dan polong yang dihasilkan tidak begitu baik dengan pembentukan biji hampa yang sangat tinggi. Selain itu, terlihat adanya kecenderungan semakin tua umur biji, semakin menurun kualitas biji yang ditunjukkan dengan kegagalan pembentukan endosperma. Semakin tua umur biji, pertumbuhan embrio semakin menurun bahkan pada umur tiga minggu hampir seluruh biji yang dihasilkan, embrionya sudah mengering dengan warna coklat muda sampai coklat. Menurut Miyazaki *et al.* (1984) pembentukan biji hasil persilangan antara *V. radiata* dan *V. mungo* sering bervariasi dari normal hingga tidak normal di mana pengisian biji sering tidak maksimal sehingga menghasilkan biji yang kisut. Kegagalan persilangan dengan menggunakan tetua betina dari varietas liar diakibatkan oleh adanya inkompatibilitas pada pembentukan zigot, yang ditunjukkan dengan semakin panjang waktu setelah polinasi semakin banyak polong yang gagal tumbuh (polong gugur).

Dari polong-polong yang terbentuk embrio diisolasi dengan mengupas kulit biji, kemudian ditanam pada medium perkecambahan. Dari keseluruhan embrio yang berhasil diisolasi, embrio yang berasal dari polong hasil persilangan dengan tetua betina kacang hijau terlihat lebih baik kualitasnya dibandingkan embrio dari hasil persilangan resiprokalnya. Embrio yang berasal dari tetua betina kacang hijau, penampilannya seperti kacang hijau, walaupun tidak sebesar embrio kacang hijau, sementara embrio yang berasal dari tetua betina kacang hitam umumnya berwarna putih dan hampir kering atau kering dengan kegagalan pembentukan endosperma yang tinggi. Hasil perkecambahannya dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2-7 terlihat keragaman persentase keberhasilan perkecambahan embrio hasil persilangan, tetapi ada kecenderungan embrio yang lebih muda, lebih sulit berkecambah dibandingkan dengan embrio yang lebih tua, dan apabila berhasil memerlukan waktu yang lebih lama untuk berkecambah (sampai 34 hari dan paling cepat 19 hari). Penampilan kecambahnya pun lebih rapuh dibandingkan dengan kecambah dari embrio yang lebih tua. Hasil ini sesuai dengan Pierik (1978) dan Bhojwani dan Razdan (1983) yang menyatakan bahwa faktor umur sangat mempengaruhi keberhasilan perkecambahan. Semakin muda embrio yang dikulturkan akan semakin sulit ditumbuhkan pada medium buatan, sedangkan semakin tua/matang embrio yang ditumbuhkan akan semakin mudah untuk tumbuh. Tetapi hal ini tidak sepenuhnya sesuai untuk embrio hasil persilangan antarspesies di mana semakin tua embrio yang dikulturkan akan semakin besar menghadapi kendala gugurnya embrio karena adanya inkompatibilitas.

**Tabel 2.** Perkecambahan biji hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (VR-34 x VR-34)

Persilangan Seksual (♀ x ♂)	Umur biji (minggu) setelah persilangan	Medium	Jumlah embrio yang ditanam	Jumlah embrio berkecambah	Waktu perkecambahan (hari)	Persentase perkecambahan
VR-34 x VR-34	1	Kn	8	0	33	07,5
		Kn+BA1	8	0	34	02,5
		KnC	8	0	-	00
		KnC + BA1	4	0	-	00
		MS	7	0	-	-0
		MS + BA1	5	0	-	-0
		½ MS	5	2	12	40
		½ MS + BA1	5	1	15	20
		MS + IAA + K	4	0	19	09,38
Total			3222	9,38%03,64%	-	9
VR-34 x VR-34	2	Kn	8	0	-	00
		Kn + BA1	6	0	-	37,5
		KnC	8	0	-	00
		KnC + BA1	8	0	-	35
		MS	5	0	-	-0
		MS+BA1	5	3	-	60
		½ MS	5	2	-	40
		½ MS + BA1	6	1	-	16,67
		MS + IAA + K	8	0	-	40
Total			37221	18,92%08,57%	-	9
VR-34 x VR-34	3	Kn	8	0	4	60
		Kn + BA1	6	0	3,5	100
		KnC	4	-1	7	25
		KnC + BA1	4	0	5	05
		MS	10	-5	16,3	50
		MS + BA1	14	14	17,5	100
		½ MS	10	-8	13,5	80
		½ MS + BA1	10	-1	20	10
		MS + IAA + K	4	0	-5	05
Total			26744	65,38%03,64%	-	9

Kn = Knudson, K = kinetin

Dari penelitian ini terlihat bahwa embrio yang berumur lebih muda (1 minggu) relatif lebih sulit berkecambah, embrio yang berhasil berkecambah memerlukan waktu yang lebih lama. Pada umur embrio 2 minggu, keberhasilan perkecambahannya meningkat kecuali pada embrio hasil persilangan Walet dengan VR-34 yang justru menurun (Tabel 4). Semakin tua umur embrio (3 minggu) persentase keberhasilannya lebih meningkat lagi kecuali pada embrio hasil persilangan Walet dengan VR-34, di mana belum ada embrio yang berkecambah. Hal ini mungkin karena adanya hambatan genetik antara Walet dengan VR-34 yang lebih besar sehingga dengan meningkatnya umur embrio semakin tinggi kemungkinan kegagalan pertumbuhan embrio bahkan kemungkinan embrionya sudah gugur/mati sehingga tidak dapat berkecambah. Fenomena ini tidak terjadi pada persilangan

**Tabel 4.** Perkecambahan biji hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (Walet x VR-34)

Persilangan seksual (♀ x ♂)	Umur biji (minggu) setelah persilangan	Medium	Jumlah embrio yang ditanam	Jumlah embrio berkecambah	Waktu perkecambahan (hari)	Persentase perkecambahan
Walet x VR-34	1	KnD	8	1	20	12,5
		KnD + BA1	5	3	24	60
		KnDC	9	0	-	0
		KnDC + BA1	4	4	19	100
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	7	0	-	0		
Total			33	24,24%	-	-
Walet x VR-34	2	KnD	8	2	13,5	25
		KnD + BA1	8	3	12	37,5
		KnDC	8	0	-	0
		KnDC + BA1	7	0	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	7	0	-	0		
Total			38	13,16%	-	-
Walet x VR-34	3	KnD	4	0	0	0
		KnD + BA1	4	0	0	0
		KnDC	4	0	0	0
		KnDC + BA1	4	0	0	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	0	0	0		
Total			20	0	-	-

KnD = Knudson, K = kinetin

yang lain (Walet x VR-35 (Tabel 2) dan Walet No. 19/1 (Tabel 6) di mana terlihat apabila semakin tua embrio yang dikulturkan akan semakin meningkat persentase keberhasilan perkecambahannya bahkan pada hasil persilangan dengan VR-35 pada umur 3 minggu keberhasilan perkecambahannya mencapai 65,38% (Tabel 2).

Pengkulturan embrio yang lebih tua/matang relatif lebih mudah karena penangananannya jauh lebih sederhana dibandingkan dengan mengkulturkan embrio yang lebih muda. Selain itu, perkecambahan embrio yang lebih matang hanya memerlukan medium yang sederhana apalagi bila pertumbuhan endospermanya sudah mendekati sempurna. Pada penelitian ini embrio hasil persilangan Walet dengan VR-35 (Tabel 2), menunjukkan semakin tua umur embrio semakin sempurna endosperma yang terbentuk (kecuali pada biji

**Tabel 5.** Perkecambahan biji hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (VR-34 x Walet)

Persilangan seksual (♀ x ♂)	Umur biji (minggu) setelah persilangan	Medium	Jumlah embrio yang ditanam	Jumlah embrio berkecambah	Waktu perkecambahan (hari)	Persentase perkecambahan
VR-34 x Walet	1	Knnd	8	0	-	0
		Knnd + BA1	4	0	-	0
		KnndC	4	0	-	0
		KnndC + BA1	4	0	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	0	-	0		
Total			24	0	-	0
VR-34 x Walet	2	Knnd	4	0	-	0
		Knnd + BA1	4	0	-	0
		KnndC	4	0	-	0
		KnndC + BA1	4	0	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	0	-	0		
Total			20	0	-	0
VR-34 x Walet	3	Knnd	-	-	-	-
		Knnd + BA1	-	-	-	-
		KnndC	-	-	-	-
		KnndC + BA1	-	-	-	-
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	-	-	-	-		
Total			-	-	-	-

Knnd = Knudson, K = kinetin

hampa). Sementara untuk embrio hasil persilangan antara Walet dengan VR-34 (Tabel 4), menunjukkan dengan bertambahnya umur embrio keberhasilan perkecambahan justru cenderung menu-run. Pada embrio hasil persilangan Walet dengan No. 19/1 (Tabel 6) meskipun dapat berkecambah tetapi perkecambahannya memerlukan waktu yang lebih lama. Hal ini menunjukkan bahwa pada persilangan ini ditemui hambatan pembentukan endosperma, di mana endosperma yang terbentuk tidak lebih baik dari embrio yang lebih muda.

Keberhasilan kultur embrio secara *in vitro* selain ditentukan oleh faktor umur embrio, juga ditentukan oleh genotipe, komposisi medium, dan lingkungan fisik serta kondisi pertumbuhan tanaman induk (Pierik, 1978). Komposisi medium sangat berperan dalam keberhasilan teknik *in vitro*. Dalam kultur embrio, medium akan berperan menggantikan fungsi dari endosperma

yang akan menyediakan hara yang diperlukan untuk menumbuhkan embrio. Apabila diperlukan pada medium dapat ditambahkan zat pengatur tumbuh dan bahan organik lainnya.

Dari hasil penelitian ini perkecambahan dapat berlangsung pada seluruh medium dasar yang dicoba dengan keberhasilan yang bervariasi. Perkecambahan terjadi baik pada medium Knudson, Knudson modifikasi, MS maupun MS yang di-encerkan dengan keberhasilan yang bervariasi. Penambahan BA 1 mg/l pada ke-tiga jenis medium dasar dapat lebih meningkatkan keberhasilan perkecambahan. Pada medium MS dengan penambahan BA, embrio yang berumur 3 minggu hasil persilangan antara Walet dan VR-35 perkecambahannya 100% dengan rata-rata waktu perkecambahan 17,5 hari (Tabel 2), sementara pada embrio yang berumur 3 minggu hasil persilangan antara Walet dan No. 19/1 (Tabel 6) yang dikulturkan pada medium Knudson modifikasi + BA 1 mg/l dapat berkecambah 100% dengan rata-rata waktu perkecambahan 12,5 hari. Komposisi medium ini juga dapat mengecambahkan 100% embrio hasil persilangan antara Walet dengan VR-34 (Tabel 4) yang berumur satu minggu dengan waktu perkecambahan 19 hari. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Gomathinayagami *et al.* (1998) yang menambahkan BA pada medium untuk mengecambahkan embrio hasil persilangan antara *V. unguiculata* dan *V. vexillata*.

Tunas-tunas hasil persilangan memperlihatkan keragaman di antara individu-dunya. Tunas *in vitro* dipelihara pada medium Gamborg dan disubkultur dengan interval 4 minggu karena ada kendala pelayuan pada tunas *in vitro* dan pertumbuhan tunasnya juga terhambat karena ada pembentukan kalus pada pangkal tunas. Untuk perbanyak secara klonal belum dapat dilakukan karena masih harus mengatasi kendala pelayuan dan pembentukan kalus pada biakan.

**Tabel 6.** Perkecambahan biji hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (Walet x No. 19/1)

Persilangan seksual (♀ x ♂)	Umur biji (minggu) setelah persilangan	Medium	Jumlah embrio yang ditanam	Jumlah embrio berkecambah	Waktu perkecambahan (hari)	Persentase perkecambahan
Walet x No. 19/1	1	Knd	9	-	-	0
		Knd + BA1	9	-	-	0
		KndC	10	-	-	0
		KndC + BA1	10	-	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	9	-	-	-	0	
Total			47	-	-	-
Walet x No. 19/1	2	Knd	8	0	-	0
		Knd + BA1	8	6	6,5	75
		KndC	9	0	-	0
		KndC + BA1	7	6	6	85,7
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	8	2	12	25		
Total			40	35%	-	-
Walet x No. 19/1	3	Knd	4	1	13	25
		Knd + BA1	4	1	10	25
		KndC	4	1	13	25
		KndC + BA1	4	4	12,5	100
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	2	12	50		
Total			20	9	-	-

Knd = Knudson, K = kinetin

**Tabel 7.** Perkecambahan biji hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (No. 19/1 x Walet)

Persilangan seksual (♀ x ♂)	Umur biji (minggu) setelah persilangan	Medium	Jumlah embrio yang ditanam	Jumlah embrio berkecambah	Waktu perkecambahan (hari)	Persentase perkecambahan
No. 19/1 x Walet	1	Kind	8	0	-	0
		Kind + BA1	4	0	-	0
		KindC	4	0	-	0
		KindC + BA1	4	0	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	0	-	0		
Total			24	0	-	0
No. 19/1 x Walet	2	Kind	4	0	-	0
		Kind + BA1	4	0	-	0
		KindC	4	0	-	0
		KindC + BA1	4	0	-	0
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	4	0	-	0		
Total			20	0	-	0
No. 19/1 x Walet	3	Kind	-	-	-	-
		Kind + BA1	-	-	-	-
		KindC	-	-	-	-
		KindC + BA1	-	-	-	-
		MS	-	-	-	-
		MS + BA1	-	-	-	-
		½ MS	-	-	-	-
		½ MS + BA1	-	-	-	-
MS + IAA + K	-	-	-	-		
Total			-	-	-	-

Kind = Knudson, K = kinetin

## KESIMPULAN

Dari hasil persilangan serta perkecambahan *in vitro* dapat disimpulkan:

1. Persentase keberhasilan persilangan tertinggi terdapat pada persilangan antara kacang hijau varietas Walet dengan kacang hitam No. 19/1, tetapi polongnya banyak yang hampa.
2. Pembentukan polong yang baik (menyerupai kacang hijau) dan kehampaan polong sangat sedikit berasal dari persilangan varietas Walet dengan VR-35.

3. Keberhasilan perkecambahan embrio hasil persilangan dengan kacang hijau sebagai tetua betina meningkat dengan meningkatnya umur embrio sampai 3 minggu.
4. Sampai akhir pengamatan embrio hasil persilangan dengan tetua betina kacang hitam belum dapat berkecambah.
5. Embrio hasil persilangan terutama antara Walet dengan VR-35 dapat berkecambah pada semua medium dasar yang digunakan, dan akan meningkat apabila ditambahkan BA 1 mg/l.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Amir, M. 1978.** Mungbean scab in Indonesia. Proc. 1<sup>st</sup> Int. Mungbean Symp. AVRDC. Taiwan. p. 161-164.
- Arora, R.K. and S.S. Mauria, 1993.** *Vigna radiata*. In Van der Maesen and S. Sumaatmadja (Eds.). Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara Kacang-kacangan. Gramedia. hlm. 88-94.
- Astanto, K. dan T. Sutarman. 1993.** Perbaikan genetik kacang hijau untuk stabilitas hasil. *Dalam* Kacang Hijau. Balittan. Malang. hlm. 25-49.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983.** Plant tissue culture. Elsevier Science. Publishers. Amsterdam. Oxford, New York, Tokyo. p. 204-235.
- Budiman, A. dan Mukhlis. 1994.** Pengaruh jenis dan takaran fungisida terhadap penyakit kudis (*Elsinoe iwatae*) pada kacang hijau di lahan kering. Risalah Hasil Penelitian Kacang-kacangan 1990-1993. Balai Penelitian Tanaman Pangan Banjarbaru. hlm. 275-280
- Ching, Y.H. and J.W. Zanetini. 1995.** Somatic hybridization of citrus with several incompatible wild relative. Florida Agricultural Experiment Station Journal: 427-437.
- Dure, L.S. 1975.** Seed formation. Ann. Rev. Plant Physiol. 26:259-278.
- Gomathianayagami, P.S. Ganeahram, R. Rathnaswamy, and N.M. Ramaswamy. 1998.** Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. Vwxillata* (L.) A. Rich. Through *in vitro* embryo culture. Euphytica 102:203-209.
- Jaiwal, P.K. and A. Gulati. 1995.** Current status and future strategies of *in vitro* culture techniques for genetic improvement of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Euphytica 86:167-181.
- Louzada, E.S. and J.W. Grosser. 1996.** Somatic hybridization of citrus with sexual incompatible wild relative. Florida Agricultural Experiment Station Journal: 437-447.

- Mariska, I., Hobir, A. Husni, M. Kosmiatin, dan Y. Rusyadi. 1997.** Penyelamatan embrio hasil persilangan antar panili budi daya dan panili liar. *Dalam* Peningkatan mutu genetik panili, lada dan jahe melalui bioteknologi. Laporan Hasil Penelitian Balitbio.
- Miyazaki, S., Kawakami, and Ishikura. 1984.** Phylogenetic Relationship Classification of *Vigna radiata-mungo* Complex. JARQ 1:225-229.
- Newell, C.A. and T. Hymowitz. 1978.** Successful wide hybridization between the soybean and wild perennial relative. *G. tomentella* Hayata. Crop Sci. 22:1062-1065.
- Pierik, R.L.M. 1978.** *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Boston, Lancaster. 334 p.
- Raghavan, V. 1986.** Variability through wide crosses and embryo rescue. *In* I.K. Vasil (*Ed.*). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants 3: 631-633.
- Singh, K.J., K.P. Kollipara, and T. Hymowitz. 1987.** Inter subgeneric hybridization of soybean with perennial species. *Glycine clandestina* Wendl. Theo. App. Genet. 74:391-386.