

Produksi Kalus Embriogenik dan Regenerasinya Setelah Seleksi *In Vitro* dengan Al dan pH Rendah pada Tanaman Padi

Ragapadmi Purnamaningsih, Ika Mariska, dan Ali Husni

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi nasional padi adalah dengan memanfaatkan lahan masam yang tersedia cukup luas di luar Pulau Jawa. Pada lahan tersebut ditemukan masalah cekaman lingkungan, yaitu tingkat ke-asaman yang tinggi, ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg, dan Mo yang rendah serta konsentrasi Al dan Mn yang mencapai tingkat beracun. Pendekatan yang efisien dan ramah lingkungan untuk menanggulangi masalah tersebut adalah dengan memperbaiki kultivar tanaman terhadap cekaman lingkungan, akan tetapi varietas yang tahan jumlahnya masih terbatas. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh nomor-nomor baru tanaman padi yang mempunyai sifat ketahanan terhadap toksisitas Al dan pH rendah. Perlakuan yang diuji adalah jenis varietas T-309 dan Rojolele dan konsentrasi aluminium (0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm). Seleksi dilakukan pada 3 tahap, yaitu tahap regenerasi, embrio, dan kalus. Rancangan disusun secara faktorial dalam rancangan lingkungan acak lengkap. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua varietas mempunyai respon yang sama pada semua jenis media yang digunakan. Pada perlakuan komposisi media, MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 3 g/l lebih banyak membentuk nodul bakal mata tunas dibandingkan dengan media lainnya. Regenerasi eksplan setelah perlakuan seleksi menunjukkan bahwa pada umumnya kedua jenis varietas dapat beregenerasi pada semua perlakuan seleksi yang diberikan kecuali pada konsentrasi Al 500 ppm. Seleksi pada tahap kalus, regenerasi dan embrio menunjukkan hasil yang sama, yaitu semakin me-ningkat konsentrasi Al maka daya regenerasi eksplan makin menurun. Seleksi pada tahap regenerasi dan embrio, daya regenerasi antara T-309 dan Rojolele tidak berbeda nyata kecuali pada seleksi tahap kalus persentase regenerasi T-309 (47,76%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan Rojolele (15,38%).

Kata kunci: *Oryza sativa*, seleksi *in vitro*, lahan masam, aluminium

ABSTRACT

One alternative to increase national productivity of rice is using marginal soil (acid soil). The problem in that soil is invironmental stress such as high soil acidity, low of mineral solubility (N, P, K, Ca, Mg, and Mo), and Al and Mn toxicity. Finding the variety which is tolerant to environmental stress could solve the problem. Unfortunately the number of variety is limited. The aim of the experiment is to get variety of rice that tolerant to the environmental stress. The treatment consisted of 2 varieties (T-309 and Rojolele) and 6 levels of aluminum concentration (0, 100, 200, 300, 400, and 500 ppm). Selection was done in three stages: regeneration, embryo, and callus. Completely randomized design with factorial arrangement was used in this experiment. Result of the experiment showed that the varieties had the same respon in all media. In the treatment of MS + 2.4-D 2 mg/l + casein hidrolysat 3 g/l produced more noded or bud formation than others. After *in vitro* selection, explant could regenerate in all Al concentration, except in Al 500 ppm. Selection on stage of

callus, regeneration and embryo had the same result. Increased of Al concentration resulting decreased of regeneration ability. In the regeneration and embryo stage, regeneration of T-309 was not different from Rojolele. In the callus stage regeneration of T-309 (47.76%) was higher than Rojolele (15.38%).

Key words: *Oryza sativa*, *in vitro* selection, acid soil, aluminum

PENDAHULUAN

Keragaman genetik yang tinggi merupakan salah satu faktor utama dalam perbaikan sifat tanaman. Secara konvensional, peningkatan keragaman genetik dapat dilakukan dengan memanfaatkan berbagai bahan genetik yang tersedia di alam dan selanjutnya dilakukan persilangan secara konvensional. Namun untuk sifat-sifat tertentu sering tidak ditemukan pada sumber gen yang ada, sehingga harus dicari cara lain untuk memperoleh sumber gen tersebut.

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman pangan yang sangat penting karena sampai saat ini beras masih digunakan sebagai makanan pokok bagi sebagian penduduk dunia terutama Asia. Di Indonesia, beras masih dipandang sebagai produk kunci bagi kestabilan perekonomian dan politik Indonesia (Baharsyah *et al.*, 1988). Setiap tahun Indonesia selalu mengimpor beras karena produksi dalam negeri belum mampu memenuhi kebutuhan yang selalu meningkat.

Indonesia saat ini menghadapi masalah pangan akibat peningkatan jumlah penduduk yang diikuti oleh banyaknya sawah subur beririgasi di Pulau Jawa yang beralih fungsi menjadi kawasan industri dan pemukiman. Selain itu, pengaruh bencana alam berupa kemarau panjang atau banjir yang terjadi hampir setiap tahun menyebabkan produksi beras menurun, sehingga untuk memenuhi keperluan nasional pemerintah harus mengimpor beras. Kondisi ini diperburuk dengan terjadinya krisis moneter yang berdampak terhadap melemahnya daya beli petani terhadap sarana produksi yang harganya melambung tinggi, terutama pupuk dan pestisida.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi bahan pangan adalah dengan memanfaatkan lahan kering yang tersedia cukup luas di luar Pulau Jawa. Dari luas total daratan Indonesia, sekitar 47,6 juta hektar (32,4%) merupakan lahan kering yang umumnya didominasi oleh tanah masam Podsolik Merah Kuning (Karama dan Abdurrachman, 1993). Sumatera merupakan pulau terluas yang memiliki jenis tanah Podsolik Merah Kuning, yaitu 20,6 juta hektar, disusul Kalimantan (16,1 juta hektar), Maluku (3,231 juta hektar), dan Sulawesi (2,0 juta hektar) sedangkan Jawa dan Madura hanya 0,33 juta hektar (Sudjadi, 1984).

Penelitian terdahulu pada lahan Podsolik Merah Kuning menunjukkan bahwa pertumbuhan tanaman pada umumnya terhambat dan produktivitasnya sangat rendah. Hal ini disebabkan karena adanya hambatan cekaman lingkungan berupa tingkat kemasaman yang tinggi (pH rendah),

ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg, dan Mo yang rendah serta konsentrasi Al dan Mn yang mencapai tingkat beracun (Notohadiprawiro, 1983).

Pada lahan masam, pengapuran merupakan salah satu upaya memperbaiki kondisi lahan, namun ternyata biaya yang harus dikeluarkan sangat mahal. Oleh karena itu, perlu diupayakan alternatif lain. Pendekatan yang lebih efisien dan ramah lingkungan untuk menanggulangi hambatan tersebut adalah melalui pemulia-an dengan memperbaiki kultivar tanaman terhadap cekaman lingkungan, di samping mempunyai produktivitas dan mutu yang tinggi. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ketahanan spesies/kultivar terhadap Al berbeda-beda (Van Sint Jan *et al.*, 1997).

Kultur jaringan merupakan salah satu teknologi alternatif yang dapat digunakan untuk membantu memecahkan masalah tersebut. Dengan berkembangnya teknologi kultur *in vitro*, maka keragaman genetik dapat ditingkatkan antara lain melalui keragaman somaklonal. Salah satu metode keragaman somaklonal yang lebih efektif dan efisien adalah seleksi *in vitro*. Melalui metode tersebut penyaringan sifat genetik lebih terarah kepada perubahan yang diinginkan.

Perubahan genetik dapat terjadi selama periode kultur *in vitro* atau karena adanya sel bermutasi pada jaringan induknya (Ahlowalia, 1988). Mutasi spontan pada sel somatik berkisar antara 0,2-3%. Keragaman tersebut dapat ditingkatkan dengan berbagai perlakuan antara lain pemberian mutagen fisik (sinar gamma) atau pemberian stres pada kumpulan sel somatik yang bersifat embriogenik.

Untuk mendapatkan genotipe baru yang dapat ditanam di lahan masam, digunakan $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ dengan kemasaman yang rendah, yaitu sekitar 4,0 sebagai komponen seleksi (Short *et al.*, 1987).

Masalah yang sering dihadapi dalam melakukan seleksi *in vitro* adalah sulitnya meregenerasikan sel yang tahan pada kondisi Al dan pH rendah. Dengan demikian, sistem regenerasi perlu dikuasai terlebih dahulu, agar sel tersebut dapat diregenerasikan kembali menjadi tanaman.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri atas 2 kegiatan, yaitu (1) induksi kalus dan (2) seleksi kalus secara *in vitro* serta regenerasinya.

Pada kegiatan pertama, penelitian dilakukan untuk produksi kalus dengan menggunakan 3 formulasi media dengan zat pengatur tumbuh yang berbeda, yaitu MS + 2,4-D 20 mg/l; MS + 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 1 mg/l + benzil adenin 1 mg/l; MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 3 g/l. Sedangkan sebagai sumber eksplan digunakan varietas T-309 dan Rojolele.

Pada kegiatan kedua dilakukan seleksi dengan menggunakan Al dan pH rendah. Penggunaan aluminium diuji pada beberapa taraf konsentrasi, yaitu 0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm dengan 15 ulangan. Benih yang telah steril

dipotong dan diambil embrionya serta ditumbuhkan pada beberapa perlakuan formulasi media dengan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda. Kultur embrio dilakukan di ruang gelap pada suhu 25°C selama 4 minggu. Untuk memunculkan sifat toksisitas Al pada media seleksi maka garam makro dari media MS di-modifikasi, yaitu kandungan NH_4NO_3 ditingkatkan, $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ dan KH_2PO_4 direndahkan serta penggunaan Fe yang tidak *dichelate* oleh EDTA. Seleksi dilakukan pada beberapa tahap, yaitu seleksi pada tahap embrio, kalus, dan regenerasi. Selanjutnya kalus yang tetap hidup pada media seleksi dipindahkan pada media regenerasi MS + benzil adenin 5 mg/l + IAA 0,8 mg/l.

Rancangan yang digunakan adalah faktorial dengan rancangan lingkungan acak lengkap. Perlakuan yang diuji adalah media tumbuh dan varietas. Parameter yang diamati struktur kalus, diameter kalus, persentase kalus yang tumbuh, persentase hidup kalus pada media seleksi, persentase kalus yang dapat beregenerasi, serta penampakan biakan secara visual di laboratorium dan rumah kaca.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 2 varietas yang digunakan, yaitu T-309 dan Rojolele memperlihatkan respon yang berbeda pada masing-masing formulasi media untuk induksi kalus. Hal tersebut terlihat dengan ukuran diameter kalus yang berbeda serta penampakannya secara visual (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Persentase pembentukan kalus pada perlakuan formulasi media

Formulasi media (mg/l)	Persentase pembentukan kalus		Rata-rata
	T-309	Rojolele	
MS + 2,4-D 0,5 NAA 1 + BA 1	92,45	92,00	92,31 ^a
MS + 2,4-D2 + CH 3	90,00	87,50	88,89 ^a
MS + 2,4-D 20	96,67	93,33	94,67 ^a
Rata-rata	92,48 ^a	90,91 ^a	

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Duncan

Tabel 2. Ukuran diameter kalus dari eksplan pada perlakuan formulasi media

Formulasi media (mg/l)	Diameter kalus (cm ²)		Rata-rata	Visual
	T-309	Rojolele		
MS + 2,4-D 0,5 NAA 1 + BA 1	0,18	0,12	0,18 ^a	Bening, globular
MS + 2,4-D 2 + CH 3	0,14	0,07	0,12 ^b	Bening, globular
MS + 2,4-D 20	0,14	0,07	0,11 ^b	Bening, globular
Rata-rata	0,19 ^a	0,08 ^b		

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Duncan

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata untuk parameter jumlah kalus yang terbentuk dari kedua jenis varietas, formulasi media yang digunakan serta interaksinya (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua varietas mempunyai respon yang sama pada semua jenis media, sedangkan ketiga media yang digunakan juga mempunyai kemampuan yang sama dalam menginduksi pembentukan kalus sehingga ketiga jenis media tersebut dapat digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dari kedua varietas yang digunakan. Kalus terbanyak diperoleh dari media MS + 2,4-D 20 mg/l. Menurut Sellars *et al.* (1990) penggunaan auksin dengan daya aktivitas kuat (antara lain 2,4-D, NAA atau dikombinasikan dengan sitokinin dengan konsentrasi rendah) umumnya digunakan untuk induksi kalus embriogenik.

Hasil penelitian Hutami *et al.* (1999) menunjukkan bahwa penggunaan auksin dengan konsentrasi tinggi (10-40 mg/l) memberikan hasil yang lebih baik untuk perkembangan kalus embriogenik tanaman kedelai. Namun dalam perkembangannya terlihat respon yang berbeda dari kedua varietas pada masing-masing formulasi media (Tabel 2). Ukuran diameter kalus T-309 lebih lebar dan berbeda nyata dengan Rojolele. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel-sel kalus T-309 lebih cepat berdediferensiasi daripada Rojolele sehingga ukurannya lebih besar. Sedangkan media MS + 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 1 mg/l + benzil adenin 1 mg/l memberikan pertumbuhan kalus yang paling cepat dibandingkan dengan media lainnya di mana kalus yang dihasilkan mempunyai diameter 0,18 cm².

Penampakan kalus secara visual menunjukkan bahwa ketiga formulasi media menghasilkan kalus yang remah (*friabel*), berwarna bening, dan terbentuk nodul. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan kalus yang diperoleh akan dapat diregenerasikan menjadi planlet. Namun demikian, kalus yang diperoleh dengan menggunakan media MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 3 g/l lebih banyak membentuk nodul dibandingkan dengan media lainnya sehingga diharapkan akan diperoleh planlet lebih banyak. Selanjutnya media yang menghasilkan nodul terbanyak adalah MS + 2,4-D 20 mg/l, sedangkan penggunaan media MS + 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 1 mg/l + benzil adenin 1 mg/l walaupun kalus yang dihasilkan ukurannya lebih besar, tetapi bersifat rhizogenik, yaitu lebih cepat membentuk akar daripada tunas. Kemungkinan hal ini disebabkan karena ketidakseimbangan unsur hara di dalam eksplan sehingga eksplan lebih dahulu membentuk akar daripada tunas, padahal tunas diperlukan agar tanaman dapat melakukan proses fotosintesis.

Selanjutnya menyatakan bahwa penambahan asam amino (antara lain glutamin, casein hidrolisat, atau arginin) pada media yang sudah mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus embriogenik, karena di dalam kloroplas, asam amino dapat berperan sebagai prekursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses seluler lainnya.

Tabel 3. Waktu regenerasi eksplan pada beberapa tahap seleksi

Tahap seleksi	Varietas (hari)	
	T-309	Rojolele
Tahap regenerasi	7	15
Tahap embrio	10	16
Tahap kalus	21	40

Dilihat dari kemampuannya dalam menginduksi pembentukan dan pertumbuhan kalus serta penampakan kalus yang dihasilkan, maka untuk selanjutnya di-gunakan media MS + 2,4D 2 mg/l + casein hidrolisat 3 g/l untuk induksi kalus.

Regenerasi Eksplan Setelah Perlakuan Seleksi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua varietas yang digunakan dapat beregenerasi setelah perlakuan seleksi *in vitro*. Namun demikian, waktu yang diperlukan untuk regenerasi berbeda-beda tergantung kepada varietas dan tahap seleksi yang diberikan (Tabel 3).

Pada umumnya varietas T-309 lebih cepat beregenerasi pada semua tahap seleksi dibandingkan dengan Rojolele. Seleksi yang diberikan ketika eksplan ber-ada pada tahap regenerasi menyebabkan eksplan lebih cepat beregenerasi baik untuk varietas T-309 maupun Rojolele.

Seleksi yang diberikan langsung pada embrio tampaknya tidak dapat meng-hentikan proses pembelahan dan pertumbuhan sel sehingga kalus tetap terbentuk dan berkembang walaupun ukurannya lebih kecil. Berlainan dengan hasil peneliti-an Mariska *et al.* (2000) pada tanaman kedelai menunjukkan bahwa seleksi yang langsung diberikan pada eksplan embrionik menyebabkan sebagian besar eksplan tidak dapat membentuk kalus.

Seleksi yang diberikan pada saat eksplan berada pada fase kalus memberi-kan respon regenerasi yang paling lambat, yaitu 21 hari untuk T-309 dan 40 hari untuk Rojolele. Diduga hal ini disebabkan karena lamanya eksplan berada pada ta-hap kalus, yaitu pada saat induksi kalus (4 minggu) dan selama seleksi (8 minggu), di mana pada fase tersebut sel terus menerus membelah sehingga dapat menurun-kan daya regenerasi jaringan. Sel somatik yang terlalu lama diinkubasi pada media yang mengandung auksin kuat dapat menurun daya regenerasinya. Namun demi-kian, semakin lama eksplan berada pada fase kalus maka kemungkinan terjadinya mutasi makin besar, sehingga harapan untuk memperoleh nomor-nomor tanaman padi yang mempunyai sifat ketahanan terhadap aluminium dan pH rendah makin besar. Selain itu, penggunaan auksin seperti 2,4-D dapat menyebabkan perubahan sifat genetik. Keragaman yang ditimbulkan disebabkan oleh daya aktivitasnya yang kuat dalam memacu proses dediferensiasi sehingga kromosom menjadi tidak stabil dan mengganggu replikasi DNA (Ahlowalia, 1988).

Seleksi *In Vitro* pada Tahap Regenerasi

Pada tahap seleksi ini embrio terlebih dahulu diinduksi membentuk kalus kemudian kalus dipindahkan pada media regenerasi dengan penambahan kompo-nen seleksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa umumnya eksplan dari ke-dua varietas dapat beregenerasi membentuk planlet pada semua taraf konsentrasi aluminium kecuali pada perlakuan Al 500 ppm (Tabel 4). Persentase regenerasi tertinggi diperoleh dari perlakuan kontrol tanpa seleksi (pH 5,8), yaitu sebesar 69,60%. Penurunan pH menjadi 4,0 tampaknya menurunkan daya regenerasi eksplan menjadi 42,90%.

Jika dibandingkan antara varietas T-309 dan Rojolele, kedua varietas mem-berikan respon yang sama dan tidak berbeda nyata berdasarkan uji statistik. Namun jumlah eksplan varietas Rojolele yang beregenerasi lebih banyak daripada T-309 walaupun waktu yang diperlukan varietas T-309 untuk beregenerasi lebih ce-pat. Diduga hal ini disebabkan karena proses diferensiasi kalus T-309 yang sangat cepat menurunkan kemampuan regenerasinya sehingga organ yang terbentuk akhirnya tertutup oleh kalus.

Penambahan Al menyebabkan penurunan daya regenerasi jaringan di mana umumnya makin tinggi konsentrasi Al yang diberikan, maka daya regenerasi eks-plan juga makin rendah walaupun secara statistik tidak berbeda nyata antara per-lakuan kontrol pada pH 5,8 dengan kontrol pada pH 4,0 dan 100 ppm. Perbedaan yang nyata baru terlihat pada penambahan Al 200, 300, 400, dan 500 ppm.

Seleksi *In Vitro* pada Tahap Embrio

Seperti halnya seleksi yang dilakukan pada tahap regenerasi maka melalui seleksi yang langsung diberikan pada embrio kedua varietas memberikan respon yang sama di mana eksplan varietas T-309 yang dapat beregenerasi adalah 33,33% dan tidak berbeda nyata dengan Rojolele (31,25%) (Tabel 5). Sedangkan penurunan pH dan penambahan Al pada semua taraf konsentrasi menurunkan daya regenerasi eksplan dan berbeda nyata dengan kontrol (pH 5,8). Persentase regenerasi tertinggi berasal dari perlakuan kontrol (pH 5,8), yaitu sebesar 76,70%. Penurunan pH menurunkan daya regenerasi eksplan menjadi 25%. Daya regenerasi eksplan meningkat dengan penambahan Al 100 ppm dan 300 ppm walaupun tidak berbeda nyata dengan kontrol pH 4,0. Diduga pada perlakuan Al 100 dan 300 ppm terjadi mutasi di mana eksplan mempunyai mekanisme lain untuk bertahan dari toksisitas Al sehingga eksplan dapat memenuhi kebutuhannya akan unsur hara atau eksplan dapat melindungi diri terhadap kerusakan karena toksisitas Al sehingga eksplan dapat bertahan hidup. Dengan kemasaman yang rendah, beberapa komponen organik dan anorganik antara lain PO_4 , NH_4^+ , dan

Tabel 4. Persentase kalus yang dapat menginduksi tunas pada seleksi tahap regenerasi

Formulasi media	T-309	Rojolele	Rata-rata
Kontrol pH 5,8	72,73	60,00	69,60 ^a
Kontrol pH 4,0	44,44	40,00	42,90 ^{ab}
Al 100	30,00	62,50	44,40 ^{ab}
Al 200	23,08	33,33	36,40 ^b
Al 300	23,08	15,30	19,20 ^{bc}
Al 400	20,00	16,67	18,80 ^{bc}
Al 500	0,00	0,00	0,00 ^c
Rata-rata	32,05 ^a	34,43 ^a	

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Duncan

Tabel 5. Persentase regenerasi eksplan pada seleksi tahap embrio

Formulasi media	T-309	Rojolele	Rata-rata
Kontrol pH 5,8	80,00	75,00	76,70 ^a
Kontrol pH 4,0	25,00	25,00	25,00 ^{bc}
Al 100	62,50	33,33	40,00 ^b
Al 200	18,18	28,57	24,00 ^{bcd}
Al 300	60,00	30,00	45,00 ^b
Al 400	18,75	0,00	11,50 ^{cd}
Al 500	0,00	0,00	0,00 ^d
Rata-rata	33,33 ^a	31,25 ^a	

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Duncan

vitamin B1 yang terdapat dalam media tidak dapat larut secara sempurna sehingga tidak tersedia secara maksimal.

Eksplan dari varietas Rojolele tampaknya mempunyai daya regenerasi yang lebih kecil dibandingkan dengan T-309, bahkan pada perlakuan Al 400 dan 500 ppm eksplan tidak dapat beregenerasi. Hal ini kemungkinan disebabkan karena varietas Rojolele lebih sensitif terhadap unsur Al. Hasil penelitian Mariska *et al.* (2000) menunjukkan bahwa seleksi yang diberikan secara langsung pada eksplan embrio kedelai, umumnya tidak dapat membentuk kalus dan tidak dapat beregenerasi. Walaupun demikian, eksplan yang dapat bertahan hidup dan dapat beregenerasi menunjukkan sifat ketahanan pada tingkat sel (Taylor, 1991). Demikian pula hanya sel yang toleran mampu hidup apabila diinkubasi pada media seleksi. Seleksi pada tingkat sel merupakan teknologi yang potensial untuk menghasilkan genotipe baru yang adaptif terhadap cekaman lingkungan.

Seleksi *In Vitro* pada Tahap Kalus

Tabel 6 menunjukkan bahwa respon yang berbeda dari kedua varietas setelah perlakuan seleksi pada tahap kalus. Pada umumnya kedua varietas dapat beregenerasi pada semua perlakuan konsentrasi aluminium kecuali pada konsentrasi Al 500 ppm.

Dari Tabel 6 terlihat bahwa eksplan T-309 yang beregenerasi lebih banyak (47,76%) dan berbeda nyata dengan Rojolele (15,38%). Sedangkan penambahan Al pada beberapa taraf konsentrasi juga memperlihatkan adanya respon yang berbeda antara kedua varietas serta berbeda nyata secara statistik. Persentase regenerasi tertinggi diperoleh dari perlakuan kontrol (pH 5,8), yaitu sebesar 66,70% yang berbeda nyata dengan semua perlakuan Al dan penurunan pH kecuali pada perlakuan Al 100 ppm. Makin tinggi konsentrasi Al maka persentase regenerasi makin rendah bahkan pada Al 500 ppm tidak ada eksplan yang dapat beregenerasi. Diduga hal ini disebabkan oleh semakin lama eksplan berada pada fase kalus di mana proses dediferensiasi terus berlangsung tanpa terjadi proses diferensiasi. Selain itu, penambahan Al ke

Tabel 6. Persentase regenerasi eksplan pada seleksi tahap kalus

Formulasi media	T-309	Rojolele	Rata-rata
Kontrol pH 5,8	85,71	54,55	66,70 ^a
Kontrol pH 4,0	62,50	11,11	35,30 ^{bc}
Al 100	81,01	11,11	50,00 ^{ab}
Al 200	44,44	16,67	28,60 ^{bc}
Al 300	50,00	11,11	31,60 ^{bc}
Al 400	25,00	5,50	13,30 ^{cd}
Al 500	0,00	0,00	0,00 ^d
Rata-rata	47,76 ^a	15,38 ^b	

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji Duncan

dalam media menyebabkan terjadi ketidakseimbangan ketersediaan unsur hara karena toksisitas Al menyebabkan eksplan tidak dapat memenuhi kebutuhannya sehingga proses diferensiasi terhambat dan akhirnya tanaman tidak mampu beregenerasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Van Sint Jan *et al.* (1997) di mana peningkatan konsentrasi Al menurunkan kemampuan regenerasi pada tanaman padi. Memberikan kondisi stres dengan konsentrasi Al yang tinggi menguntungkan karena stres dapat menurunkan jumlah tanaman yang akan di-seleksi secara *in vitro* sehingga merupakan seleksi yang bertahap. Menurut Ojima dan Ohira (1986) masalah regenerasi akan meningkat apabila massa sel dikulturkan pada media yang mempunyai komponen seleksi yang umumnya bersifat toksin. Selain itu, diperlukan waktu 4 tahun untuk meregenerasikan sel wortel yang tahan Al. Demikian pula sel tembakau yang telah diseleksi dengan Al sulit beregenerasi (Yamamoto *et al.*, 1994).

Jumlah eksplan varietas T-309 lebih bagus daripada Rojolele, kemungkinan disebabkan karena kemampuan regenerasi T-309 lebih baik daripada Rojolele. Hal yang berlainan dari varietas Rojolele, kemungkinan daya regenerasinya lebih rendah, selain itu dengan makin lamanya eksplan berada pada fase kalus makin menurunkan daya regenerasi jaringan. Namun demikian, pada eksplan yang dapat beregenerasi kemungkinan telah terjadi mutasi sehingga eksplan dapat bertahap hidup. Zat pengatur tumbuh banyak dilaporkan sebagai salah satu faktor utama yang menyebabkan mutasi pada kultur *in vitro* (Singh *et al.*, 1987).

Dibandingkan dengan T-309 tampaknya daya regenerasi Rojolele lebih rendah pada semua perlakuan Al dan penurunan kemampuan regenerasi sangat besar. Diduga Rojolele sangat sensitif terhadap adanya Al dan penurunan pH.

KESIMPULAN

Persentase pembentukan kalus antara T-309 dan Rojolele sama tetapi diameter kalus T-309 lebih lebar. Kalus yang diperoleh dengan menggunakan media MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hidrolisat 2 mg/l lebih banyak membentuk nodul bakal mata tunas. Seleksi pada tahap embrio dan tahap regenerasi memberikan persentase regenerasi yang sama antara varietas T-309 dan Rojolele tetapi pada tahap kalus, daya regenerasi T-309 (47,76%) lebih besar daripada Rojolele (15,38%). Semakin meningkat konsentrasi Al maka semakin menurun daya regenerasi biakan membentuk tunas. Pada konsentrasi Al 500 ppm semua kalus Rojolele maupun T-309 tidak mampu beregenerasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlowalia, B.S. 1988.** Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. *In* Serial, J. (Ed.). Somaclonal Variation and Crop Improvement. Martinus Nijhoff Publisher. USA. p. 14-27.
- Baharsyah, S., F. Kasryno, dan D.H. Darmawan. 1988.** Kedudukan padi dalam perekonomian Indonesia. *Dalam* Ismunadji, M., S. Prihardjono, M. Syam, dan A. Widjono (Eds.). Padi. Balitbang Pertanian. Puslitbangtan. hlm. 1-35.
- Hutami, S., I. Mariska, 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. Balitbio. Bogor. (Tidak dipublikasi).
- Karama, A.S. dan A. Abdurrachman. 1993.** Optimasi pemanfaatan sumber daya lahan berwawasan lingkungan. Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Pangan. III. Puslitbangtan. Badan Litbang Pertanian. Bogor, 23-25 Agustus 1993. hlm. 98-112.
- Mariska, I., Hobir, M. Tombe, D. Manohara, S. Hutami, W.H. Adil, Y. Rusyadi, E.G. Lestari, R. Purnamaningsih, D. Sukmadjaja, M. Kosmiatin, A. Husni, dan S. Rahayu. 2000.** Peningkatan keragaman genetik melalui seleksi *in vitro* dan keragaman somaklonal untuk ketahanan terhadap faktor biotik dan abiotik. Laporan Hasil Penelitian. Balitbio. Bogor. (Tidak dipublikasi).
- Notohadiprawiro, T. 1983.** Persoalan tanah masam dalam pembangunan pertanian Indonesia. Bull. Faperta UGM 18:44-47.
- Ojima, K. and K. Ohira. 1986.** Characterization and regeneration of aluminium tolerant variant from carrot cell culture. Jap. Ann. Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Sellars, R.M., G.M. Southward, and G.C. Philips. 1990.** Adventitious somatic embryogenesis from culture immature zygotic embryos of peanut and soybean. Crop Sci. 30:408-413.
- Short, K.C., I. Warburton, and A.V. Roberts. 1987.** *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Hort. 212:329-334.
- Singh, K.J., K.P. Kollipara, and T. Haymowitz. 1987.** Inter subgeneric hybridization of soybean with perennial species. *Glycine clandestina* Wendl. Theor. App. Genet. 74:391-396.
- Sudjadi, M. 1984.** Problem soil in Indonesia and their management. *In* Pricharda *et al.* (Eds.). Ecology and Management of Problem Soil in Asia. Food and Fertility Tech. Center for Asia and Pacific Region. Taiwan.

- Taylor, G.J. 1991.** Current views of the Al stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. and Physiol.* 10:57-93.
- Van Sint Jan, V., C. Costa de Macedo, J.M. Kinet, and J. Bouharmont. 1997.** Selection of Al resistant plants from a sensitive rice cultivar using somaclonal variation, *in vitro* selection, and hydroponic cultures. *Euphytica* 97:303-310.
- Yamamoto, Y., R. Sanae, Yi-Chieh, K. Ono, K. Monibu, and H. Matsumoto. 1994.** Quantitative estimation of aluminum toxicity in cultured tobacco cells. Correlation between aluminum uptake and growth inhibitor. *Plant Cell Physiol.* 35(4):575-583.