

REGENERASI KEDELAI VARIETAS GROBOGAN DARI EKSPAN BUKU KOTILEDON PADA BERBAGAI KONSENTRASI BAP DAN 2,4-D

Yustinus U. Anggraito¹, Noor A. Habibah²

^{1,2}Jurusan Biologi FMIPA UNNES Semarang

Gd. Lt. 1 D6 Kampus Sekaran Gunungpati Semarang.

E-mail: tinus_anggra@yahoo.co.id

ABSTRAK

Regenerasi eksplan pascatransformasi merupakan tahapan penting dalam transformasi tanaman. Oleh sebab itu, perlu didapatkan prosedur regenerasi eksplan kedelai yang optimal. Jenis eksplan yang digunakan adalah eksplan buku kotiledon dari kedelai kultivar Grobogan. Induksi kalus menggunakan kombinasi 2,4-D dan BAP, dengan konsentrasi masing-masing 2.0 mg/l, 3.0 mg/l, 4.0 mg/l dan 3.0 mg/l, 3.5 mg/l, dan 4.0 mg/l. Induksi tunas dilakukan menggunakan 3.0 mg/l, 3.5 mg/l, dan 4.0 mg/l BAP. Parameter yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus, jumlah hari pembentukan kalus, morfologi dan warna kalus, persentase kalus membentuk tunas, jumlah hari pembentukan tunas, dan jumlah tunas yang dihasilkan. Kombinasi terbaik untuk menginduksi kalus pada eksplan buku kotiledon kedelai kultivar Grobogan adalah 4.0 mg/l 2,4-D dan 3.0 mg/l BAP. Konsentrasi 3.5 mg/l BAP merupakan konsentrasi terbaik untuk induksi tunas pada eksplan buku kotiledon kedelai kultivar Grobogan.

Kata-kata kunci: 2,4-D, BAP, Buku Kotiledon, Regenerasi

PENDAHULUAN

Kedelai dikenal sebagai spesies yang sukar untuk ditransformasi dan diregenerasi (rekalsitran). Regenerasi eksplan setelah melalui tahapan transformasi seringkali mengalami hambatan. Keberhasilannya bergantung pada berbagai faktor di antaranya genotip eksplan yang akan ditransformasi, zat pengatur tumbuh (ZPT), dan jenis eksplan yang digunakan.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik yang secara alami disintesis oleh tanaman dan mempengaruhi proses-proses fisiologis pada konsentrasi rendah (Davies 2002). Proses fisiologis yang dipengaruhi di antaranya pertumbuhan, diferensiasi, dan perkembangan tanaman. Dalam kultur jaringan, ada dua golongan ZPT yang sangat penting yaitu sitokinin (BAP, TDZ, iP, dsb.) dan auksin (IAA, 2,4-D, IBA, dsb.). ZPT mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan, dan organ. Interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen, menentukan arah perkembangan suatu kultur.

Sistem regenerasi digunakan untuk menghasilkan tanaman yang dapat direkayasa secara genetik melalui embriogenesis somatik dari biji belum matang (Christou *et al.* 1989) atau organogenesis dari buku kotiledon (Paz *et al.* 2004; Shan *et al.* 2005). Pada kacang ercis, modifikasi genetik didasarkan pada organogenesis dari buku kotiledon, dengan cara mensubkultur buku kotiledon pada medium yang ditambah 2,4-D (Tzitzikas *et al.* 2004).

Kedelai cv. Bonminoru mampu menghasilkan tunas dari eksplan hipokotil dalam medium MS (Kaneda *et al.* 1997). Shan *et al.* (2005), melaporkan bahwa eksplan dari kedelai cv. White tidak mampu menghasilkan tunas dalam medium MS. Namun Shan *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa kecambah yang berasal dari eksplan yang dipraperlakukan dengan 2,4-D, menunjukkan peningkatan jumlah tunas. Sehingga dia menyimpulkan bahwa komponen medium dengan kuantitas ZPT mempengaruhi regenerasi tanaman. Hal ini disebabkan interaksi dan perimbangan ZPT dapat menentukan arah perkembangan eksplan. Regenerasi kedelai juga bergantung pada genotip tanpa memperhatikan jalur perkembangannya (Klein & Jones 1999; Donaldson & Simmonds 2000).

Salah satu faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis eksplan dalam kultur *in-vitro* adalah genotip tanaman asal eksplan diisolasi. Dong *et al.* (2009) menyebutkan bahwa



respon masing-masing eksplan tanaman sangat bervariasi tergantung dari spesies, bahkan varietas tanaman asal eksplan tersebut. Pengaruh genotip ini umumnya berhubungan dengan faktor-faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan, seperti kebutuhan nutrisi, zat pengatur tumbuh, lingkungan kultur, dll. Oleh karena itu, komposisi media, zat pengatur tumbuh dan lingkungan pertumbuhan yang dibutuhkan oleh masing-masing varietas tanaman bervariasi.

Perbedaan respon genotip tanaman tersebut dapat diamati pada perbedaan eksplan masing-masing varietas untuk tumbuh dan beregenerasi. Masing-masing varietas tanaman berbeda kemampuannya dalam merangsang pertumbuhan tunas aksilar, baik jumlah tunas maupun kecepatan pertumbuhan tunas aksilarnya. Hal serupa juga terjadi pada pembentukan kalus, laju pertumbuhan kalus serta regenerasi kalus menjadi tanaman lengkap baik melalui pembentukan organ-organ adventif maupun embrio somatik.

Komposisi dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan ke dalam media kultur tergantung pada jenis eksplan yang dikulturkan dan tujuan pengkulturannya. Konsentrasi ZPT optimal yang ditambahkan ke dalam media tergantung pula kandungan hormon pertumbuhan endogen yang terdapat pada eksplan tersebut. Komposisi yang sesuai ini dapat diperkirakan dari percobaan-percobaan yang telah dilakukan sebelumnya dibarengi percobaan untuk mengetahui komposisi ZPT yang sesuai dengan kebutuhan dan arah pertumbuhan eksplan yang diinginkan.

Kedelai varietas Grobogan memiliki produktivitas tinggi (>1.5 ton/ha) namun tidak toleran terhadap cekaman abiotik seperti tanah masam. Peningkatan toleransi kedelai kultivar Grobogan terhadap cekaman abiotik dapat dilakukan melalui pemuliaan konvensional dengan persilangan ataupun rekayasa genetik melalui transformasi genetik. Setelah ditransformasi dengan gen-gen yang diinginkan, eksplan selanjutnya diregenerasikan untuk mendapatkan tanaman transgenik. Pada umumnya terjadi penurunan kemampuan regenerasi eksplan pascatransformasi. Oleh karena itu harus diketahui kombinasi konsentrasi ZPT yang mampu menghasilkan efisiensi regenerasi yang tinggi. Jadi, meskipun terjadi penurunan kemampuan beregenerasi, masih terdapat sejumlah eksplan yang mampu beregenerasi. Data konsentrasi optimum 2,4-D dan BAP untuk meregenerasi tanaman kedelai kultivar Grobogan belum banyak tersedia. Jenis eksplan yang sesuai untuk diregenerasikan juga belum banyak diketahui. Sumber eksplan dalam regenerasi kedelai bisa berasal dari eksplan setengah biji, buku kotiledon, biji belum matang, daun, dsb. Dalam penelitian ini digunakan eksplan buku kotiledon. Oleh karena itu penelitian tentang jenis eksplan dan kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP dalam meregenerasi tanaman kedelai cv. Grobogan perlu dilakukan.

Tujuan penelitian adalah menentukan kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP yang tepat untuk menginduksi kalus dan konsentrasi BAP yang tepat untuk menginduksi tunas dari kalus eksplan buku kotiledon kedelai varietas Grobogan. Dengan diketahuinya konsentrasi 2,4-D dan BAP yang optimum untuk regenerasi tanaman kedelai maka akan didapatkan protokol baku untuk menginduksi dan meregenerasi tanaman kedelai.

BAHAN DAN METODE

Biji kedelai varietas Grobogan didapatkan dari Balitbiogen Cimanggu Bogor. Penelitian dilakukan di Lab. Kultur Jaringan Jur. Biologi Unnes Semarang.

Sterilisasi Biji

Biji kedelai direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam dalam 30% Bayclin selama 15 menit dan dicuci dengan akuades steril sebanyak lima kali. Biji steril kemudian direndam dalam akuades selama 16 jam. Eksplan buku kotiledon diperoleh dengan cara mengecambahkan biji steril dalam media MS0 selama tujuh hari. Biji yang berkecambah dipotong bagian hipokotil \pm 3 mm dari pangkal hipokotil. Selanjutnya kotiledon dibuka dan aksis embrionik/tunas primer dibuang sehingga didapatkan dua eksplan buku kotiledon dari setiap kecambah.

Induksi Kalus

Eksplan buku kotiledon ditanam pada media induksi kalus dengan sisi datar menghadap ke atas dengan pangkal eksplan tertanam. Medium induksi kalus mengandung garam MS, vitamin B5,



3% sukrosa, dan pH disesuaikan pada 5.8 dan diberi 0.3% Phytigel, selanjutnya diautoklaf pada 121°C selama 20 menit. Digunakan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP dengan konsentrasi masing-masing: 2.0 mg/l, 3.0 mg/l, 4.0 mg/l dan 3.0 mg/l, 3.5 mg/l, 4.0 mg/l, sehingga didapatkan sembilan kombinasi perlakuan. Kultur dipelihara dengan kondisi 16 jam terang dengan cahaya fluoresen dan 8 jam gelap pada suhu 25-26°C. Lima puluh eksplan ditanam dan diulang empat kali dan frekuensi pembentukan kalus ditentukan 2 minggu setelah inisiasi. Parameter pengamatannya adalah persentase eksplan membentuk kalus, hari terbentuknya kalus, serta morfologi dan warna kalus.

Induksi Tunas dan Multiplikasi

Dua minggu setelah induksi kalus dilakukan induksi tunas. Eksplan dipindahkan ke medium induksi tunas yang mengandung garam MS, vitamin B5, 3% sukrosa ditambahkan BAP (3.0 mg/l, 3.5 mg/l, dan 4.0 mg/l), pH 5.7, dengan 0.3% Phytigel, selanjutnya diautoklaf pada 121°C selama 20 menit. Eksplan dipelihara pada kondisi cahaya yang sama dengan kondisi pengkalusan selama 4 minggu. Parameter pengamatan adalah persentase eksplan membentuk tunas, hari terbentuknya tunas, dan jumlah tunas pada setiap perlakuan.

Analisis statistik

Berbagai konsentrasi ZPT (2, 4-D dan BAP) diuji untuk induksi kalus dan regenerasi tanaman dari sumber eksplan setengah biji dan buku kotiledon. waktu inisiasi kalus dan tunas, jumlah kalus dan tunas dianalisis dengan Anova Dua Jalur (*Two way ANOVA*). Data warna dan morfologi kalus dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus

Pemberian BAP dan 2,4-D pada berbagai konsentrasi dapat menginduksi pembentukan kalus yang bervariasi. Pada eksplan buku kotiledon, persentase eksplan yang membentuk kalus sangat tinggi dengan rerata mencapai 97.50%. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan buku kotiledon memberikan rerata eksplan berkalus sangat tinggi. Eksplan buku kotiledon dihasilkan dari proses perkecambahan selama tujuh hari, kemungkinan memiliki kandungan auksin endogen yang cukup tinggi. Auksin endogen ini bersinergi dengan 2,4-D (auksin eksogen) menimbulkan proses biokimiawi yang menyebabkan pembentukan kalus yang lebih tinggi. Senyawa ini umum digunakan untuk menginduksi kalus. Pada eksplan buku kotiledon, persentase eksplan berkalus tertinggi diperoleh dari kombinasi 4.0 mg/l 2,4-D dan 3.0 mg/l BAP, sebesar 98.8%. Menurut Bhojwani & Razdan (1996), 2,4-D dan 2,4,5-T sangat efektif untuk induksi dan pertumbuhan kalus. Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian da Silva *et al.* (2003) yang menemukan bahwa penggunaan 1 mg/l 2,4-D dikombinasikan dengan 0.1 mg/l kinetin mampu menginduksi kalus *G. wightii* sebesar 83.2%.

Pembentukan kalus sangat penting dalam proses regenerasi tanaman karena memungkinkannya dihasilkan tunas dari sel-sel baru, bukan berasal dari meristem yang sudah ada sebelumnya. Hal ini sangat berarti untuk proses transformasi karena bila transforman berasal dari sel meristem yang sudah ada sebelumnya dapat menyebabkan khimera, yaitu tanaman dengan kombinasi sel transforman dan bukan transforman. Sebaliknya bila berasal dari sel baru, kemungkinan mendapatkan tanaman transforman utuh akan lebih besar. Namun konsentrasi 2,4-D yang digunakan adalah konsentrasi rendah, karena bertujuan untuk proliferasi awal saja. Pada berbagai penelitian induksi kalus pada umumnya menggunakan konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi (20-40 mg/l), terutama untuk embriogenesis somatik. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang diperoleh oleh Tomlin *et al.* (2002), yang memperoleh respon pembentukan kalus berkisar 30.36% untuk NK-12 dan 84.01% untuk Jack dalam medium yang mengandung 91 µM 2,4-D. Namun hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian Joyner *et al.* (2010) yang menggunakan kedelai varietas Pyramide dan mendapatkan persentase pembentukan kalus mencapai 100% pada kombinasi 2,4-D dan NAA, masing-masing sebesar 3-15 µM.



Tabel 1 Pembentukan kalus pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D

Jenis eksplan	Kombinasi (mg/l)		Eksplan berkalus (%)	Waktu berkalus (hari)
	BAP	2,4-D		
Buku kotiledon	2.0	3.0	96.3 a	9.1 a
	2.0	3.5	96.7 a	8.3 a
	2.0	4.0	97.3 a	7.3 a
	3.0	3.0	97.9 b	10.9 ab
	3.0	3.5	98.7 b	10.3 a
	3.0	4.0	98.8 b	9.7 a
	4.0	3.0	97.7 ab	12.7 b
	4.0	3.5	97.3 ab	11.9 ab
	4.0	4.0	96.8 a	11.3 b
		Rerata:		97.5

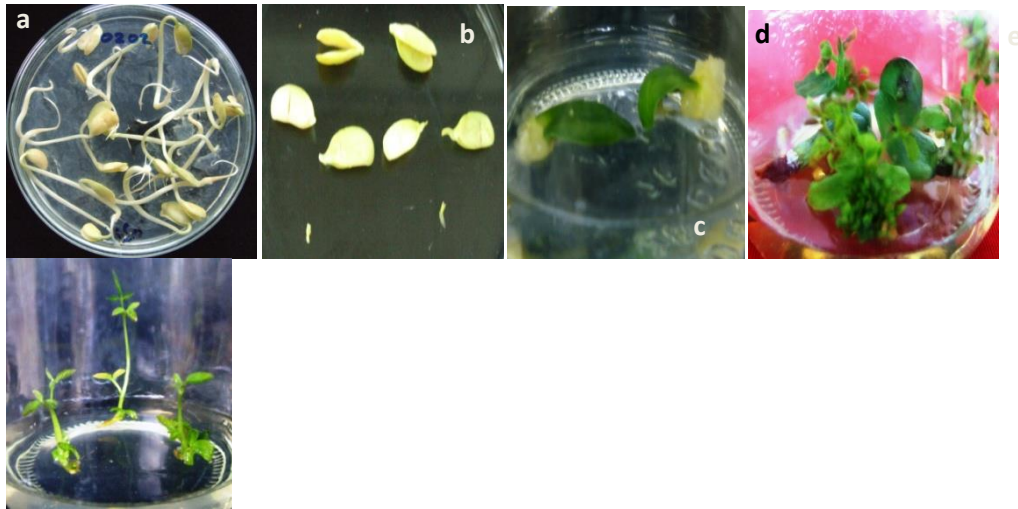
Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada $\alpha=0.05$.

Dalam berbagai penelitian ditemukan bahwa jaringan eksplan yang lebih muda (meristematis) akan lebih responsif terhadap pemberian ZPT. Hal ini juga ditegaskan oleh Bhojwani & Razdan (1996), bahwa kebutuhan akan ZPT bervariasi berdasarkan jaringan dan aras ZPT endogen. Sairam *et al.* (2003), mendapatkan bahwa induksi kalus terjadi dalam tujuh hari pada berbagai kombinasi ZPT dan terbanyak dalam 21 hari dari buku kotiledon dan juga bagian lain dari kotiledon.

Eksplan buku kotiledon yang sudah dikecambahkan selama tujuh hari, memiliki ukuran lebih besar dibandingkan sebelum dikecambahkan. Hal ini berarti luas bidang permukaan sentuhan yang bereaksi dengan ZPT juga akan lebih besar sehingga akan menghasilkan pertambahan berat kalus yang lebih tinggi. Dalam penelitiannya pada *Glycine wightii*, da Silva *et al.* (2003) menemukan bahwa 2,4-D 1.0 mg/l dan kinetin 0.1 mg/l memberikan rerata berat kalus segar tertinggi yang berasal dari eksplan buku kotiledon.

Da Silva *et al.* (2003) menyebutkan bahwa produksi kalus terutama bergantung pada penentuan perimbangan ZPT, meskipun perimbangan ini bervariasi terutama dalam hubungannya dengan tipe eksplan dan spesies tanaman yang masih dalam penelitian. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang diperoleh oleh Radhakrishnan dan Ranjhitakumari (2007), yang mendapatkan bahwa inisiasi kalus pada kedelai India cv. CO3 dengan proliferasi sel tertinggi diperoleh dari eksplan setengah biji yang ditanam dalam media yang mengandung 13.3 μM BAP dan 13.5 μM 2,4-D. Sebetulnya pada regenerasi jalur organogenesis melalui pembentukan tunas, kuantitas kalus yang tinggi tidak terlalu penting karena bertujuan untuk menginduksi pembentukan sel baru sehingga mengurangi kemungkinan pembentukan khimera pada saat transformasi. Oleh karena itu 2,4-D yang digunakan memiliki konsentrasi rendah. Sebaliknya pada regenerasi jalur embriogenesis somatik diperlukan sel-sel baru dalam jumlah besar, sehingga digunakan 2,4-D dalam konsentrasi tinggi. Dengan memperhatikan parameter persentase pembentukan kalus dari eksplan buku kotiledon tampak bahwa kombinasi 4.0 mg/l 2,4-D dan 3.0 mg/l BAP memberikan hasil yang terbaik dibandingkan kombinasi yang lain.





Gambar 1 Tahapan regenerasi kedelai dari eksplan buku kotiledon a. Eksplan buku kotiledon dalam media perkecambahan satu minggu. b. Penyiapan eksplan buku kotiledon. c. Pembentukan kalus. d. Induksi tunas. e. Pemanjangan tunas.

Morfologi Kalus

Morfologi kalus dari eksplan menunjukkan dua penampakan kalus yang dominan yaitu remah dan kompak. Sedangkan dari warna kalus eksplan menunjukkan variasi warna dari putih, putih-kuning, kuning, putih-hijau. Morfologi dan warna kalus dalam sejumlah laporan menunjukkan kalus kompak dan berwarna putih-hijau merupakan kalus yang potensial untuk beregenerasi. Tomlin *et al.* (2002), menemukan bahwa embrio berkualitas tinggi (padat dan hijau) berkorelasi dengan embrio matang yang dihasilkan dalam jumlah tinggi. Selain itu, Hong *et al.* (2007), melaporkan bahwa daerah hijau muda dari kalus merupakan daerah yang paling kompeten dalam membentuk struktur yang berdiferensiasi menjadi tunas. Shan *et al.* (2005), yang menggunakan eksplan buku kotiledon juga menemukan bahwa semua tunas muncul dari massa kalus yang berwarna kehijauan. Pengenalan terhadap karakteristik morfologi dan warna kalus sangat penting untuk penentuan tahap awal terjadinya pembentukan tunas pada kedelai.

Tabel 2. Pengaruh berbagai kombinasi BAP dan 2,4-D terhadap morfologi dan warna kalus

Jenis eksplan	Kombinasi (mg/l)		Morfologi kalus	Warna kalus
	BAP	2,4-D		
Buku kotiledon	2.0	2.0	Lembek	putih-hijau
	2.0	3.0	Lembek	putih-hijau
	2.0	4.0	Lembek	putih
	3.0	2.0	Padat	putih
	3.0	3.0	Padat	putih-hijau
	3.0	4.0	Padat	hijau
	4.0	2.0	Padat	putih-hijau
	4.0	3.0	Lembek	putih-hijau
	4.0	4.0	Lembek	putih

Morfologi kalus yang lembek cenderung basah karena kandungan airnya yang tinggi. Sebaliknya pada kalus yang padat cenderung mengkilat. Pengamatan menunjukkan kalus yang padat dan mengkilat dan berwarna putih-hijau atau hijau menunjukkan pembentukan tunas yang lebih tinggi dibandingkan kalus yang lembek dan berwarna putih. Karakteristik ini penting untuk diperhatikan



dalam proses regenerasi karena bisa menjadi petunjuk awal keberhasilan regenerasi. Namun hal ini masih perlu dibuktikan pada regenerasi dengan sumber eksplan dan ZPT yang digunakan.

Induksi Tunas

Persentase pembentukan tunas dari kalus yang berasal dari eksplan buku kotiledon, sebesar 79.80%. Kalus dari eksplan buku kotiledon memberikan respon pembentukan tunas tertinggi pada pemberian BAP 3.0 mg/l (84.2%). Sairam *et al.* (2003) mendapatkan bahwa frekwensi regenerasi bervariasi dari 32.5% untuk Williams 82, hingga 37.5% untuk Loda pada medium yang mengandung 8.8 µM BAP. Sedangkan Ma *et al.* (2008) mendapatkan persentase pembentukan tunas sebesar 98.4-99.6% pada pemberian 0.4 mg/l BAP pada empat varietas kedelai Jilin 35, Dongnong 42, Hefeng 25 dan Hefeng 41.

Tabel 3. Pengaruh berbagai kombinasi BAP terhadap persentase pembentukan tunas, waktu pembentukan tunas dan jumlah tunas

Jenis eksplan	BAP (mg/l)	Membentuk tunas (%)	Membentuk tunas (hari)	Rata-rata jumlah tunas
Buku kotiledon	3.0	84.2 b	21.8 a	4.3 a
	3.5	78.3 a	23.6 a	4.5 a
	4.0	76.9 a	26.1 b	4.6 a
	Rerata:	79.80	23.83	4.47

Respon pembentukan tunas menunjukkan bahwa eksplan buku kotiledon, membutuhkan waktu 21.8 hari hingga 26.1 hari. Eksplan buku kotiledon menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi BAP, akan menyebabkan semakin tertundanya pembentukan tunas, meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata di antara keduanya. Sairam *et al.* (2003) mendapatkan bahwa tunas tunas muncul 15 hari setelah subkultur kalus pada media induksi tunas.

Eksplan buku kotiledon pada 4.0 mg/l BAP memberikan rerata tertinggi, yaitu sebanyak 4.6 tunas. Meskipun demikian dari berbagai konsentrasi BAP yang digunakan secara statistik tidak menunjukkan perbedaan nyata. Hasil penelitian ini mirip dengan yang dilaporkan oleh Olhoff *et al.*, (2003) dan Paz *et al.* (2004), yang menggunakan 7.5 µM BAP untuk protokol buku kotiledon juga mendapatkan laju regenerasi yang rendah ketika digunakan pada sistem setengah biji. Paz *et al.* (2006) menegaskan bahwa kondisi kultur yang dipotimasi dalam sistem buku kotiledon tidak serta merta dapat diterapkan untuk sistem setengah biji Melalui peningkatan lingkungan hormonal yang optimum pada eksplan secara *in vitro*, maka kemampuan sel-sel yang tertransformasi untuk beregenerasi menjadi tanaman dapat ditingkatkan. Hasil penelitian ini juga tidak jauh berbeda dengan yang diperoleh oleh Sairam *et al.* (2003), yang mendapatkan bahwa induksi kalus dan diferensiasi tunas diperoleh dari ujung proksimal eksplan kotiledon pada medium modifikasi Murashige and Skoog (MS) yang mengandung masing-masing mengandung 2.26 µM 2,4-D dan 8.8 µM BAP. Selain itu, Mederos *et al.* (1997) dan Moura (1998), menyebutkan bahwa induksi tunas dan multiplikasi spesies *Glycine* berkisar dari 2 hingga 5.5 tunas per eksplan, tergantung pada jenis eksplan yang digunakan. Sedangkan Radhakrishnan dan Ranjithakumari (2007) mendapatkan rerata sebesar 6 tunas per eksplan pada kedelai India cv. CO3. Dengan menggunakan eksplan buku kotiledon utuh, Ma *et al.* (2008) berhasil mendapatkan rerata jumlah tunas yang tinggi, yaitu dari 17-33 tunas per eksplan pada konsentrasi BAP 0.4 mg/l.

Jumlah tunas per eksplan sangat penting diketahui, karena bila jumlah tunas regenerasi kedelai non-transformasi sangat sedikit untuk setiap eksplan (<3), maka dikhawatirkan pascatransformasi, jumlah tunas yang dihasilkan akan terlalu rendah sehingga menghasilkan efisiensi regenerasi yang rendah. Sejumlah penelitian menunjukkan terjadinya penurunan jumlah tunas yang terbentuk pascatransformasi, oleh karena itu tingginya jumlah tunas per eksplan akan memiliki nilai strategis yang menentukan keberhasilan transformasi.



Data tentang pembentukan tunas pada kedelai non-transformasi merupakan informasi penting bila akan melakukan transformasi tanaman kedelai, karena dengan data ini dapat diperkirakan berapa persen eksplan membentuk tunas, berapa hari penundaan pembentukan tunas, dan jumlah tunas yang dapat dihasilkan pasca- transformasi. Dalam transformasi, eksplan mengalami perlakuan fisik dan kimiawi yang tidak dialami pada regenerasi eksplan non-transformasi, sehingga wajar jika terjadi penurunan kemampuan untuk beregenerasi. Oleh karena itu optimasi regenerasi kedelai varietas Grobogan ini sangat penting untuk proses selanjutnya, yaitu transformasi tanaman kedelai dengan berbagai tujuan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan analisis hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kombinasi terbaik untuk menginduksi kalus pada eksplan buku kotiledon kedelai varietas Grobogan adalah 4.0 mg/l 2,4-D dan 3.0 mg/l BAP
2. Konsentrasi 3.5 mg/l BAP merupakan konsentrasi terbaik untuk induksi tunas pada eksplan buku kotiledon kedelai varietas Grobogan.
3. Eksplan buku kotiledon memberikan respon yang baik dalam pembentukan tunas pada kedelai varietas Grobogan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani SS. & Razdan MK. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Tokyo: Elsevier. 779 hal.
- Christou P, McCabe DE & Swain WF. 1989. Stable transformation of soybean callus by DNA coated gold particles. *Plant Physiol*. 87: 671–674.
- Da Silva AL, Caruzo CS, Moreira RA, Horta ACG. 2003. *In vitro* induction of callus from cotyledon and hypocotyl explants of *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc. *Ciênc. Agrotec. Lavras*. 27(6): 1277-1284.
- Davies PJ. 2002. *Plant Hormone: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 833 hal.
- Donaldson PA. & Simmonds DH. 2000. Susceptibility of *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep*. 19: 478–484.
- Dong C, Wensheng H, Shikui S, Hongbo S, Cunxiang W, Yongsheng G, Tianfu H. 2009. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:45–52.
- Hong HP, Zhang HY, Olhoft P, Hill S, Wiley H, TorenE, Hillebrand H, Jones T, Cheng M, Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:558–568.
- Joyner EY, Boykin LS, Lodhi MA. 2010. Callus induction and organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. Pyramid from mature cotyledons and embryos. *The Open Plant Sci. J*. 4:18-21.
- Klein TM & Jones TJ. 1999. Methods of genetic transformation: the gene gun. In: Vasil IK (ed) *Molecular Improvement of Cereal Crops* (hal. 21–42). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, Harada K, Akihama T, Kitamura K. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Plant Cell Re*. 17: 8-12.
- Mederos S, San-Andrés L, Luis JG. (1997). Rosmanol controls explants browning of *Hypericum canariense* L. during *in vitro* establishment of shoots. *Acta Soc. Bot. Pol*. 66: 347–349.
- Moura M. 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* aiton, an endemic azorean species, by micropropagation. *In Vitro Cell & Dev Biol Plant* 34: 244–248.



- Olhott PM, Fligel LE, Donovan CM, Somers DA. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216: 723-735.
- Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K. 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136:167–179
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25: 206-213.
- Radhakrishnan R & Ranjithakumari B.D. 2007. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *Jour.of Agric. Tech.* 3(2): 287-297.
- Sairam RV, Franklin G, Hassel R, Smith B, Meeker K, Kashikar N, Parani M, Al Abed D, Ismail S, Berry K, Goldman SL. 2003. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 79–85.
- Shan Z, Raemakers K, Emmanouil N, Tzitzikas ZMA, Richard G, Visser F. 2005. Development of a high efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Plant Cell Rep.* 24: 507-512.
- Tomlin ES, Branch SR, Chamberlain D, Gabe H, Wright MS, Stewart CN Jr. 2002. Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo induction and maturation capability from immature cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 38:543-548.
- Tzitzikas EN, Bergervoet M, Raemakers K, Vincken JP, Lammeren A, Visser RGF. 2004. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by a cyclic organogenic system. *Plant Cell Rep.* 23: 453-461.

DISKUSI

Penanya 1: Sri Ngabekti

Pertanyaan :

- Apakah konsentrasi BAP berpengaruh terhadap induksi kalus?
- Manakah konsentrasi BAP yang paling efektif?

Jawab :

- Iya, konsentrasi BAP berpengaruh sebagai pemicu untuk munculnya tunas sejak awal. Penelitian sebelumnya menggunakan konsentrasi BAP dan 2,4-D dalam induksi kalus menghasilkan kalus yang lebih tinggi.
- Ada dua kemungkinan penggunaan konsentrasi BAP, 3.0 dan 3.5 mg/L. Namun uji statistik tidak menunjukkan hasil yang berbeda, sehingga secara teknis dipilih konsentrasi 3.0 mg/L

Penanya 2 : Yudi Rinanto

Pertanyaan :

Apakah varietas yang diteliti ini sudah dikoleksi? Saran saya, untuk mencari referensi ke Balitbang Malang.

Jawab:

Saran untuk referensi silang kedelai Grobogan ke Balitbang Malang diterima.

