

**PENGARUH OSMOTIKUM PADA PEMBENTUKAN DAN
PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK KEDELAI
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

TUGAS AKHIR

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

Oleh :
LALITA ANGGI OSCARINA
0110910029-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

PENGARUH OSMOTIKUM PADA PEMBENTUKAN DAN PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) SECARA *IN VITRO*

Oleh:

LALITA ANGGI OSCARINA
0110910029-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 29 April 2008
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.
NIP. 131 837969

Ir. Retno Mastuti, MAg.Sc.D.Agr.Sc.
NIP. 131 879 408

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si.
NIP. 131 971 480

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lalita Anggi Oscarina
NIM : 0110910029-91
Program Studi : Biologi
Penulis Tugas Akhir Berjudul : **Pengaruh Osmotikum Pada
Pembentukan dan Perkembangan Embrio Somatik Kedelai
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di Daftar Pustaka dalam Tugas Akhir ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata Tugas Akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 April 2008
Yang Menyatakan,

Lalita Anggi Oscarina
NIM. 0110910029-91

PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR

Tugas Akhir ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**Pengaruh Osmotikum Pada Pembentukan dan Perkembangan
Embrio Somatik Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)**

Lalita Anggi Oscarina, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti.
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
Universitas Brawijaya, Malang. 2008.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum serta genotip tanaman pada pembentukan dan perkembangan Embrio Somatik (ES) kedelai. Embrio somatik diinduksi pada media MS + vitamin B5 + Sukrosa 1,5% + 2,4D 10 ppm + NAA 10 ppm. Evaluasi pengaruh osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES kedelai dilakukan dengan mengkultur eksplan ES pada media induksi ES dengan penambahan manitol, sorbitol, PEG dan NaCl pada konsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5%. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan tiga faktor yaitu genotip, jenis dan konsentrasi osmotikum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan osmotikum menghambat pembentukan ES pada genotip Petek, Lumajang Bewok dan 3B14. Penambahan NaCl dengan berbagai konsentrasi yang diuji cenderung lebih menghambat pembentukan ES dibandingkan dengan osmotikum lainnya. Selain menghambat, NaCl juga menyebabkan eksplan yang ditanam mati. Penambahan manitol dan sorbitol 2,5% lebih efisien meningkatkan perkembangan ES dalam maturasi dibandingkan dengan osmotikum yang lain. Selain jenis dan konsentrasi osmotikum, respon pembentukan dan perkembangan ES pada media penambahan osmotikum juga dipengaruhi genotip kedelai yang diuji. Pembentukan ES genotip Petek pada media penambahan osmotikum cenderung lebih terhambat dibandingkan 2 genotip yang lain. Sedangkan perkembangan ES fase hati genotip 3B14 meningkat.

Kata kunci: embrio somatik, kedelai, maturasi, osmotikum

The Effects of Osmoticum in Formation and Development of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Somatic Embryo

Lalita Anggi Oscarina, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti.
Department of Biology, Faculty of Mathematics and Sciences.
Brawijaya University, Malang. 2008.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effects of osmoticum and genotypes of soybean on somatic embryos (SE) forming and developing. Somatic embryos were induced on MS media + B5 vitamin + 1,5% sucrose + 10 ppm 2,4-D + 10 ppm NAA. The evaluation of osmoticum effect in formation and development of soybean SE was conducted by culturing the SE explant on induction media by adding manitol, sorbitol, PEG and NaCl at concentration 2,5%, 5% and 7,5%. The research was carried out in a factorial randomized complete block design (RCBD) with 3 factors namely, genotype, osmoticum various and concentration. The results of this research showed that added osmoticum inhibited SE formation on Petek, Lumajang Bewok and 3B14 genotype. Added NaCl with various concentration on media tend to more inhibited SE formation than the others. Beside inhibiting, NaCl also caused explant on media were died. Adding manitol and sorbitol 2,5% more efficiently increased development of SE maturation than the others. Beside various and concentration of osmoticum, SE formation and development also effected by genotype. Somatic embryos formation of Petek genotype on osmoticum media tend to more inhibited than two other genotypes. Development of SE heart phase of 3B14 genotype increased.

Keyword : maturation, osmoticum, somatic embryos, soybean

KATA PENGANTAR



Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan penelitian tentang **“Pengaruh Osmotikum Pada Pembentukan dan Perkembangan Embrio Somatik Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)”**.

Penelitian ini tugas akhir yang merupakan salah satu mata kuliah wajib dan merupakan syarat akhir untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi. Dengan dilaksanakannya penelitian ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan ilmu yang didapatkan di bangku kuliah serta dapat menambah wawasan, pengetahuan, dan pengalaman.

Dalam menyusun laporan penelitian ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung ataupun secara tidak langsung selama pelaksanaan penelitian. Rasa terima kasih tersebut penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Wahyu Widoretno, M.Si. dan Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc.D.Agr.Sc. selaku Dosen Pembimbing I dan II yang telah banyak memberikan bimbingan serta pengarahan selama penyelesaian skripsi ini.
2. Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, MSc.St, Rodliyati Azrianingsih, Ph.D dan Nunung Harijati, Ph.D. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran, kritik dan pertanyaan dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. dan Bapak/ Ibu dosen pengajar serta staf TU jurusan Biologi yang telah membagi ilmu dan pengetahuannya serta membantu pengerjaan tugas akhir ini.
4. Orang tua penulis terima kasih atas doa-doanya sehingga penulis mampu menghantarkan pada tujuan hidupnya
5. Eko Nur Cahyo terima kasih atas kesabaran dan dukungannya
6. Laboran laboratorium FKM atas bantuannya selama penelitian sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar

7. Teman-teman angkatan 2001 terima kasih atas kenangan dan kebersamaan
8. Teman-teman penghuni Kertosentono 111a terimakasih atas bantuan dan doanya
9. Pihak-pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu terima kasih atas bantuannya.

Sampai saat ini, penulis menyadari bahwa di dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan yang perlu diperbaiki. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik, saran dan masukan guna kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis hanya bisa berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta pengetahuan baru bagi segenap pembaca dan apabila pada penulisan skripsi ini ada banyak kesalahan maka penulis hanya bisa menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya.

Malang, 29 April 2008

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
 BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	3
1.3. Tujuan	3
1.4. Manfaat	3
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Umum Kedelai	4
2.2. Pengembangan Varietas Unggul Kedelai	5
2.3. Embriogenesis Somatik	5
2.4. Tahapan Embriogenesis Somatik	6
2.5. Pengaruh Osmotikum Terhadap Perkembangan dan Maturasi ES Sekunder Kedelai	8
 BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat	10
3.2. Bahan Tanaman	10
3.3. Rancangan percobaan	10
3.4. Pembuatan Media induksi ES kedelai dan Uji Osmotikum	11
3.5. Induksi dan Pemeliharaan ES Kedelai	11
3.6. Pengaruh Osmotikum Pada Pembentukan dan Perkembangan ES Kedelai	12

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Osmotikum pada Pembentukan ES dari 3 Genotip Kedelai	13
4.2 Pengaruh Osmotikum pada Perkembangan ES dari 3 Genotip Kedelai	17

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan.....	27
5.2. Saran.....	27

DAFTAR PUSTAKA	28
----------------------	----

LAMPIRAN	33
----------------	----

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1. Fase perkembangan embrio somatik (globuler, hati, torpedo dan kotiledon).....	7
Gambar 4.1. Pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum pada pembentukan ES dari 3 genotip kedelai	14
Gambar 4.2. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap penghambatan pembentukan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji.....	15
Gambar 4.3. Fase embrio somatik kedelai setelah dikultur selama 30 hari pada media induksi ES	17
Gambar 4.4. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase globuler dari 3 genotip kedelai	18
Gambar 4.5. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase hati dari 3 genotip kedelai.....	19
Gambar 4.6. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase torpedo dari 3 genotip kedelai	20
Gambar 4.7. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase kotiledon dari 3 genotip kedelai.	21
Gambar 4.8. Pengaruh osmotikum pada persentase maturasi ES dari 3 genotip kedelai	22
Gambar 4.9. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase globuler dan hati pada 3 genotip kedelai yang diuji ..	23
Gambar 4.10. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penuruna perkembangan ES fase torpedo dan kotiledon serta maturasi ES pada 3 genotip kedelai yang diuji.....	24

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 3.1. Perlakuan uji osmotikum.....	10
---	----



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi makronutrien dan mikronutrien MS serta vitamin B5.....	36
Lampiran 2. Komposisi Larutan Stok Media MS, Vitamin B5, Myinositol dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	37
Lampiran 3. Hasil analisa data dengan uji BNJ pengaruh jenis dan konsentrasi larutan osmotikum serta genotip pada pembentukan dan perkembangan ES kedelai	38
Lampiran 4. Pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES dari 3 genotip kedelai.....	41
Lampiran 5. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap penghambatan pembentukan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji.....	43
Lampiran 6. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji.....	43
Lampiran 7. Nilai potensial osmotik pada jenis dan konsentrasi osmotikum	44



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kedelai merupakan salah satu tanaman kacang-kacangan dengan kandungan protein, lemak dan vitamin yang tinggi (Najiyati dan Danarti, 1999). Produksi kedelai semakin menurun dari tahun ke tahun, sedangkan kebutuhan penduduk Indonesia terhadap kedelai semakin meningkat. Upaya yang dilakukan pemerintah untuk mengatasi penurunan produksi kedelai melalui pemuliaan tanaman secara konvensional dengan seleksi dan hibridisasi atau persilangan. Persilangan tanaman kedelai menghadapi kendala yaitu terbatasnya persediaan sumber genetik kedelai yang unggul (Poespodarsono, 1985). Oleh karena itu dilakukan usaha pemuliaan tanaman secara non konvensional melalui kultur *in vitro*.

Pemuliaan tanaman kedelai secara *in vitro* dapat dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Regenerasi tanaman kedelai hasil kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis (Franklin dkk., 2004; Reichert dkk. 2003; Sairam dkk., 2003) atau embriogenesis somatik dari eksplan (Widoretno dkk., 2003). Embriogenesis somatik adalah proses perkembangan embrio dari sel-sel atau jaringan somatik (Evans dkk., 2003). Embriogenesis sangat penting dalam perbanyakan tanaman dan digunakan sebagai metode dalam bioteknologi. Embrio somatik (ES) merupakan materi yang sesuai untuk rekayasa genetik dan induksi variasi somaklonal. Keuntungan dari embriogenesis somatik adalah efisiensi proses, morfologi dan sitologi planlet yang seragam serta proliferasi dan frekuensi regenerasi tanaman yang tinggi.

Induksi ES kedelai dapat dilakukan dengan mengkultur kotiledon muda pada media Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan vitamin B5, sukrosa 1,5% dan zat pengatur tumbuh yaitu NAA (*Naphthalenaacetic acid*) dan 2,4D (*2,4 Dichlorophenolxyacetic acid*) masing-masing 10 ppm (Widoretno dkk., 2003). Walaupun ES dalam jumlah besar dapat diperoleh dalam waktu singkat, namun demikian regenerasi tanaman dari ES masih mengalami kendala. Hasil penelitian Lippman dan Lippman (1999), Trijatmiko dan Harjosudarmo (1996), menunjukkan bahwa frekuensi keberhasilan ES kedelai berkembang menjadi planlet hanya berkisar 25-45%. Sedangkan hasil penelitian Widoretno dkk. (2003) menunjukkan

frekuensi regenerasi ES yang lebih tinggi yaitu sebesar 76%, namun beberapa ES berkembang tidak normal dan peluang ES abnormal ini untuk membentuk planlet relatif masih rendah. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan perkembangan ES sehingga menunjang keberhasilan regenerasi ES.

Regenerasi plantlet melalui embriogenesis somatik meliputi beberapa tahapan perkembangan embrio, yaitu fase globuler, hati dan terpedo, serta kotiledon yang mengalami maturasi menjadi plantlet (Bhojwani, 1990). Menurut Santoso (2003) dan Mckersie (1997) salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan perkembangan ES adalah tekanan osmotik di dalam media (Santoso, 2003; Mckersie, 1997). Tekanan osmotik di dalam maupun di luar sel yang terjaga mampu mendukung perkembangan ES pada sebagian tanaman. Komposisi media yang tepat dengan penambahan osmotikum mampu meningkatkan persentase maturasi ES terutama pada tahapan akhir embriogenesis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa larutan osmotikum dapat meningkatkan perkembangan ES. Menurut Jurgens dkk. (1994), osmotikum dengan konsentrasi tertentu diperlukan pada tahapan akhir untuk menyempurnakan embriogenesis. Hasil penelitian Prem dkk. (2000) menunjukkan bahwa penambahan mannitol 3% pada media mampu meningkatkan jumlah maturasi ES pada *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Persentase maturasi ES *Abies numidica* meningkat akibat pemberian PEG-4000 (*Polyethylene Glycol-4000*) dengan konsentrasi 7,5-10% pada media (Vookava dkk., 2002). Menurut D'Onofrio (2000) konsentrasi NaCl 5 mM mampu meningkatkan produksi ES kedelai.

Terkait dengan pemanfaatan ES sebagai salah satu metode paling efisien dalam regenerasi tanaman dan sebagai model penelitian dalam perkembangan embrio dan aspek fisiologis, maka diperlukan suatu upaya untuk meningkatkan pembentukan dan perkembangan ES kedelai. Upaya tersebut dapat dilakukan dengan mengamati pembentukan dan perkembangan ES kedelai dalam media yang telah ditambahkan osmotikum.

1.2 Permasalahan

Permasalahan yang perlu dikaji dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana pengaruh jenis dan kosentrasi larutan osmotikum pada pembentukan dan perkembangan embrio somatik kedelai ?
2. Bagaimana respon genotip kedelai pada pembentukan dan perkembangan embrio somatik pada media dengan penambahan beberapa jenis osmotikum ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui pengaruh jenis dan kosentrasi larutan osmotikum pada pembentukan dan perkembangan embrio somatik kedelai
2. Mengetahui respon genotip kedelai pada pembentukan dan perkembangan embrio somatik pada media dengan penambahan beberapa jenis osmotikum

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan efisiensi maturasi embrio somatik untuk meningkatkan regenerasi embrio somatik menjadi tanaman



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Kedelai

Di Indonesia kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) telah dikenal sejak lama sebagai salah satu tanaman sumber protein nabati dengan kandungan 39-41% yang diolah menjadi bahan makanan, minuman serta penyedap cita rasa makanan misalnya yang terkenal adalah tempe, kecap, tauco dan tauge. Sebagai bahan makanan kedelai sangat berkhasiat bagi pertumbuhan dan menjaga kondisi sel-sel tubuh. Kedelai banyak mengandung unsur dan zat-zat penting seperti protein, lemak, karbohidrat dan sebagainya.

Kebutuhan penduduk Indonesia akan kedelai dari tahun ke tahun semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya laju pertumbuhan penduduk dan berkembangnya industri pengolahan bahan makanan dari kedelai (Deptan, 2001). Meski demikian, produksi kedelai semakin menurun. Hal ini dapat dilihat dari perhitungan statistika pada tahun 2001 sebesar 0,82 juta ton biji kering atau mengalami penurunan sekitar 19,17% dibandingkan produksi pada tahun 2000. penurunan produksi kedelai tersebut disebabkan oleh turunnya luas panen dan produktivitas (BPS, 2002).

Pemerintah Indonesia berusaha keras dalam meningkatkan produksi kedelai dengan menyeleksi varietas-varietas kedelai yang mempunyai sifat unggul. Varietas unggul kedelai yang dikehendaki oleh pengguna mempunyai sifat berdaya hasil tinggi, tahan terhadap hama dan penyakit, mutu biji baik, tahan disimpan, adaptif dengan lingkungan bermasalah, serta bentuk dan warna kulit biji baik sesuai dengan kegunaannya (Allard, 1960 dan Sumarno, 1993). Saat ini di Indonesia mempunyai plasma nutfah kedelai di lapang kurang lebih ada 55 varietas dan 750 nomer galur. Salah satu diantaranya adalah varietas Petek dan Lumajang Bewok. Sedangkan 3B14 tergolong galur kedelai. Kebanyakan varietas yang ditumbuhkan untuk memenuhi kebutuhan akan benih kedelai untuk tujuan kormersial. Perbedaan varietas kedelai tersebut terletak pada kemampuan adaptasi, genetik, warna, bentuk, daya hasil dan kandungan minyak.

Varietas kedelai berdasarkan hasil panen, dikelompokkan menjadi varietas kedelai berdaya hasil rendah yaitu <1,7 ton/ha dan varietas kedelai berdaya hasil tinggi yaitu >1,7 ton/ha. Varietas Petek dan Lumajang Bewok termasuk dalam varietas kedelai berdaya hasil

rendah. Perbedaan lainnya diantara genotip kedelai adalah ketahanan terhadap penyakit maupun hama serta kandungan lemak dan protein dalam biji (Suhartina, 2003).

2.2. Pengembangan Varietas Unggul Kedelai

Upaya pemerintah untuk meningkatkan produksi kedelai dilakukan dengan dua cara yaitu secara konvensional dan non konvensional. Pemuliaan konvensional secara umum sering diartikan sebagai pemuliaan tanaman kedelai yang melibatkan aktivitas persilangan dan seleksi pada tingkat individu tanaman. Peningkatan produksi kedelai secara konvensional dapat dilakukan melalui seleksi dan hibridisasi atau persilangan. Tujuan dari seleksi dan hibridisasi adalah untuk mendapatkan kedelai dengan sifat yang unggul salah satunya produksinya yang tinggi. Intensitas seleksi dan hibridisasi kedelai bergantung pada ketersediaan sumber genetik yang unggul. Apabila ketersediaan sumber genetik yang unggul di lapang masih rendah maka seleksi antar varietas unggul tidak dapat terjadi. Kendala inilah yang menyebabkan pengembangan varietas unggul kedelai mulai dialihkan dengan metode non konvensional. Metode ini berdasarkan pada prinsip-prinsip biologi molekuler yaitu dengan teknik kultur jaringan (*in vitro*). Pengembangan varietas unggul kedelai melalui seleksi *in vitro* merupakan salah satu alternatif prospektif yang dapat digunakan. Dengan seleksi *in vitro*, kondisi lingkungan (suhu, pH dan kelembaban) dapat dikontrol. Organogenesis dan embriogenesis somatik sering digunakan dalam pengembangan varietas unggul kedelai secara *in vitro*.

2.3. Embriogenesis somatik

Regenerasi tanaman kedelai hasil kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui organogenesis (Franklin dkk., 2004; Reichert dkk., 2003; Sairam dkk., 2003) serta embriogenesis (Widoretno dkk., 2003; Pardal dkk., 2002). Embriogenesis somatik merupakan proses perkembangan embrio dari sel-sel atau jaringan somatik (Evans dkk., 2003). Embriogenesis somatik merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman dengan sifat tertentu. Kelebihan embriogenesis somatik jika dibandingkan dengan metode yang lainnya adalah: kecepatan multiplikasinya tinggi (Pardal dkk., 2002), memungkinkan untuk memproduksi tanaman dalam jumlah tinggi dari sumber (eksplan)

terbatas dan dalam waktu yang relatif singkat, dapat diperoleh dari kultur suspensi sehingga diperoleh embrio dalam jumlah banyak (Techo & Rungnoi, 2000), dapat diulang dan reproduksinya tinggi (Barwale & Widholm, 1990).

Induksi embriogenesis somatik pada kedelai dapat dilakukan langsung dari eksplan embrio zigotik muda (Barwale dkk., 1986) atau dari kotiledon muda (Bailey dkk., 1993). Produk embriogenesis somatik adalah ES yang secara langsung dapat diperoleh dari eksplan dan secara tidak langsung diperoleh dari induksi sel determinan embriogenik pada masa kalus yang belum terorganisasi (Karkonen, 2001). Embrio somatik dapat dikecambahkan untuk membentuk tanaman dan dapat diperbanyak untuk mendapatkan lebih banyak lagi ES melalui proses yang disebut embriogenesis sekunder (Tang dkk., 2000). Embriogenesis primer merupakan pertumbuhan embrio somatik dari eksplan tanaman dan embriogenesis sekunder adalah proses pembentukan ES dari eksplan yang berupa embrio (Raemakers dkk., 1994).

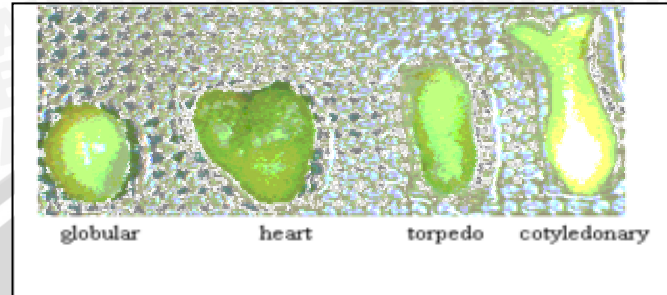
Media induksi ES meliputi komposisi media, garam mineral, vitamin, sukrosa, seperti yang terkandung pada media MS (Mckersei, 1997). Penelitian Widoretno dkk. (2003) menunjukkan bahwa media dasar MS dengan penambahan vitamin B5, sukrosa 1,5% serta kombinasi NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm mampu menginduksi ES dengan frekuensi yang tinggi yaitu sebesar 76 %.

Embriogenesis somatik dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya adalah sumber eksplan, komposisi media, zat pengatur tumbuh, kondisi lingkungan seperti cahaya, temperatur, pH media serta kondisi tekanan osmotik didalam media (Santoso, 2003; Tulecke, 1987). Sumber dan ukuran eksplan yang digunakan mempengaruhi frekuensi embriogenesis. Jaringan tanaman kedelai yang digunakan sebagai eksplan untuk induksi embriogenesis somatik adalah kotiledon. Eksplan embrio zigotik dengan panjang 4-7 mm memberikan frekuensi embriogenesis tertinggi (Barwale dkk., 1986). Zat pengatur tumbuh berperan pada proses pertumbuhan, diferensiasi dan metabolisme sel (Bajaj, 1983; Warren, 1993). NAA dan 2,4 D dengan konsentrasi masing-masing 10 ppm memberikan hasil embriogenesis terbaik (Widoretno dkk., 2003).

2.4. Tahapan Embriogenesis Somatik

Embrio somatik merupakan sel tunggal yang kompeten yang kemudian berkembang menjadi ES dewasa (kotiledon) dan siap

untuk dikecambahkan (Finer dan Mc Mullen, 1991; Finer et al., 1996). Embrio somatik dari sel tunggal tersebut berdiferensiasi menjadi struktur bipolar yang terdiri dari bagian titik pertumbuhan tunas dan akar (Smith, 2000). Menurut Litz dan Gray (1992), tahap perkembangan embrio somatik terdiri dari tahap globular, hati (fase *heart*), torpedo dan embrio dewasa (fase kotiledon). Perbedaan tahapan perkembangan tersebut dapat dilihat secara morfologi (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Fase perkembangan embrio somatik (globuler, hati, torpedo dan kotiledon) (Pollard, 1998)

Tahapan globuler merupakan tahapan awal dari embriogenesis somatik. Tahapan globuler terbentuk dari sel tunggal dan berbentuk bulat yang membelah menjadi proembrio (Chawla, 2003). Fase globuler berkembang menjadi ES yang berbentuk hati. Pada tahapan ini sel membelah membentuk dua tonjolan yang nantinya akan berkembang menjadi kotiledon primordia. Tonjolan tersebut mengalami pemanjangan membentuk torpedo. Torpedo berkembang menjadi kotiledon muda. Pada fase ini sudah terbentuk *Shoot Apical Meristem* (SAM) dan *Root Apical Meristem* (RAM) serta berkembang prokambium (Smith, 2000).

2.5. Pengaruh Osmotikum Pada Pembentukan dan Perkembangan ES Kedelai

Potensial air di dalam dan di luar sel sangat mempengaruhi pembentukan sel. Penurunan potensial air di dalam sel mengakibatkan sel menjadi kisut atau keluarnya air dari sel. Sebab proses pergerakan molekul gas atau zat terlarut dalam larutan secara

terus-menerus dari daerah yang memiliki potensil tinggi ke daerah yang memiliki potensial rendah sampai mencapai keseimbangan (Campbell, 1999). Keseimbangan tersebut dapat dicapai dengan bantuan penambahan osmotikum pada media. Kondisi air pada eksplan yang terjaga mampu menunjang perkembangan dari ES. Fase akhir ES (fase kotiledon) ditanam pada media sederhana yang mengandung garam inorganik, vitamin dan sukrosa 2 % dapat tumbuh normal tanpa adanya periode dormansi. Sedangkan fase awal ES (fase globuler-hati) tidak dapat tumbuh pada media sederhana. Perkembangan embrio dan perubahan sel seperti pemanjangan sel dan pembentukan vakuola memerlukan hormon (auksin dan sitokinin) dan osmotikum tinggi (19% sukrosa atau manitol). Osmotikum dengan konsentrasi rendah diperlukan pada tahapan akhir untuk menyempurnakan embriogenesis (Flinn dkk., 1991). Osmotikum juga telah diketahui dapat meningkatkan sintesis beberapa jumlah protein dalam perkembangan embrio (Skriver dan Mundy, 1990).

Senyawa osmotikum pada umumnya digunakan untuk menurunkan potensial air pada tanaman. Beberapa senyawa osmotikum telah digunakan dalam penapisan dan evaluasi tingkat toleransi tanaman terhadap kekeringan, diantaranya adalah gula, garam (Mexal dkk., 1974), PEG (Mexal dkk, 1974 dan Blum, 1988) serta manitol dan sorbitol yang merupakan isomernya (Rajashekar dkk, 1995). Senyawa osmotikum lainnya meliputi asam organik, asam amino dan ion organik. Osmotikum yang digunakan pada penelitian ini yaitu manitol, sorbitol, PEG dan NaCl. Osmotikum memberikan efek yang berbeda pada tanaman tergantung jenis dan konsentrasi yang digunakan. Beberapa senyawa osmotikum seperti gula dan garam yang diharapkan dapat mengontrol potensial air tanaman ternyata memberikan hasil berupa respon tanaman yang tidak diinginkan, misalnya dapat diserap dan digunakan oleh tanaman ataupun memberikan efek toksik pada tanaman (Mexal dkk, 1974). Sorbitol ditemukan pada tanaman tingkat tinggi, sebagai *photoassimilate* utama pada kebanyakan spesies dalam *Rosaceae*. Pada beberapa penelitian sorbitol juga ditambahkan pada media bersama dengan sukrosa digunakan sebagai sumber karbon (Moing dkk. 1992).

Osmotikum seperti gula alkohol mampu melewati dinding sel dan menyebabkan plasmolisis sementara sampai larutan tersebut

menuju ke sitosol sehingga terjadi pemulihan tekanan osmotik (Attree and Fowke, 1993). Sebaliknya molekul PEG terlalu besar untuk melewati dinding sel dan tidak menyebabkan plasmolisis. Berdasarkan hasil penelitian Attre dkk., (1991) PEG lebih efektif dalam menginduksi maturasi ES pada beberapa spesies konifer.

Hasil penelitian Mhaske dkk., (1998) menunjukkan bahwa 10,9% sorbitol pada media mendukung akumulasi perkembangan ES kacang tanah tetapi pengaruh manitol pada konsentrasi yang sama tidak memberikan efek. Manitol yang digunakan sebagai osmotikum mampu mengurangi kekeringan pada biji yang dikultur secara *in vitro*. Dengan pemberian osmotikum diharapkan dapat menjaga potensial air dari ES sehingga menunjang perkembangan ES tersebut.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret 2005 sampai bulan Maret 2007, bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur Jaringan, dan Mikroteknik, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Bahan Tanaman

Penelitian ini menggunakan eksplan ES sekunder dari 3 genotip kedelai yaitu : Petek, Lumajang Bewok dan 3B14, hasil sub kultur penelitian sebelumnya. Benih kedelai yang digunakan diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang (Balitkabi).

3.3. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan rancangan acak kelompok (RAK) faktorial. Variabel yang digunakan ada tiga yaitu: genotip kedelai, jenis osmotikum dan konsentrasi untuk masing-masing osmotikum (Tabel 3.1). Perlakuan tersebut masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali sebagai kelompok..

Tabel 3.1. Perlakuan Uji Osmotikum

Genotip	Ulangan	Larutan osmotikum (%)												
		o(kontrol)	Manitol			Sorbitol			PEG			NaCl		
			2.5	5	7.5	2.5	5	7.5	2.5	5	7.5	2.5	5	7.5
Petek	1													
	2													
	3													
Lumajang bewok	1													
	2													
	3													
3B14	1													
	2													
	3													

3.4. Pembuatan Media Induksi ES kedelai dan Media Uji Osmotikum

Media yang digunakan ada dua macam yaitu (1) media cair induksi dan pemeliharaan ES dan (2) media uji pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES dari 3 genotip kedelai yang diuji. Media induksi ES kedelai terdiri atas komponen makro dan mikronutrien MS, myoinositol, vitamin B5, sukrosa 1,5%, 2,4-D 10 ppm, dan NAA 10 ppm (Widoretno dkk., 2003). Komposisi makro, mikronutrien MS dan vitamin B5 tercantum pada lampiran 1. Komponen media perlakuan osmotikum sama dengan media induksi ES sekunder hanya ditambah dengan larutan osmotikum dengan jenis dan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan uji (Tabel 3.1). Sebelum membuat media dilakukan pembuatan larutan stok (lampiran 2) untuk memudahkan pembuatan media.

Pembuatan 1 liter media cair untuk induksi ES sekunder dilakukan dengan pemipetan larutan stok (makronutrien dan mikronutrien, vitamin B5 dan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan NAA masing-masing 10 ppm). Selanjutnya ditambah sukrosa dan akuades sampai volume mendekati 1000 ml. Setelah semua bahan terlarut, dilakukan pengukuran pH dengan menggunakan pH meter sampai pH mencapai 5,8. Apabila pH terlalu rendah maka dapat ditambah dengan beberapa tetes NaOH 0,1 N dan jika terlalu tinggi diturunkan dengan menambah HCl 0,1 N. Untuk pembuatan media perlakuan osmotikum sama dengan media induksi ES tetapi sebelum dilakukan pengukuran pH, media perlakuan osmotikum ditambah dengan larutan osmotikum sesuai perlakuan (jenis dan konsentrasi). Kemudian dituangkan dalam botol kultur yang didalamnya telah diberi busa sintesis dan kertas saring diatasnya sebagai penyangga eksplan supaya tidak tenggelam. Botol kultur ditutup rapat dengan plastik. Media disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 10 menit.

3.5. Induksi dan Pemeliharaan ES Kedelai

Induksi dan pemeliharaan ES dilaksanakan dengan menanam ES sekunder ke dalam media induksi ES cair yang mengandung makro + mikronutrien MS + Vitamin B5 + sukrosa 1,5% + NAA 10 ppm + 2,4-D 10 ppm secara aseptik didalam Laminar Air Flow (LAF). Setiap varietas ditanam pada ± 20 botol media kultur dengan masing-

masing botol kultur berisi 5 kumpulan ES (*clump*) dimana satu *clump* terdiri dari 4 ES. Botol-botol kultur yang telah ditanami, diinkubasi dalam rak kultur pada kondisi gelap selama 30 hari pada suhu 24-25°C. Embrio somatik yang terbentuk digunakan sebagai eksplan untuk bahan uji osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES kedelai.

3.6. Pengaruh Osmotikum pada Pembentukan dan Perkembangan ES Kedelai

Pengujian pengaruh osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES kedelai dilakukan dengan mengkultur ES yang berumur 30 hari ke dalam media perlakuan (Tabel 3.1). Selain itu ES juga dikultur pada media MS tanpa penambahan osmotikum sebagai kontrol.

Setiap perlakuan pemberian konsentrasi dari tiap jenis larutan osmotikum yang diujikan untuk masing-masing genotip kedelai diulang sebanyak 3 kali (3 botol). Setiap botol media perlakuan berisi 3 *clump* ES. Botol kultur yang berisi eksplan disimpan dalam ruangan dengan suhu 24-25°C pada kondisi gelap.

Pembentukan dan perkembangan ES diamati setelah 30 hari dengan menggunakan mikroskop binokuler. Pengamatan pembentukan dan perkembangan ES kedelai yang dikultur meliputi :

1. Jumlah ES yang terbentuk pada tiap eksplan
2. Persentase jumlah tiap tipe perkembangan ES kedelai (globuler, hati, torpedo, kotiledon)
3. Persentase maturasi (Ul-Hag & Zafar, 2004)

$$\% \text{ Maturasi} = \frac{\sum ES_{\text{kotiledon}}}{\sum ES_{\text{globuler}}} \times 100\%$$

4. Persentase penurunan jumlah ES

$$\% \text{ Penurunan } \Sigma ES = \frac{\sum ES_{\text{kontrol}} - \sum ES_{\text{osmotikum}}}{\sum ES_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis statistika dengan uji ANOVA. Apabila terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan selang kepercayaan 95 %. Data tersebut dianalisis menggunakan program SPSS ver.10.0.

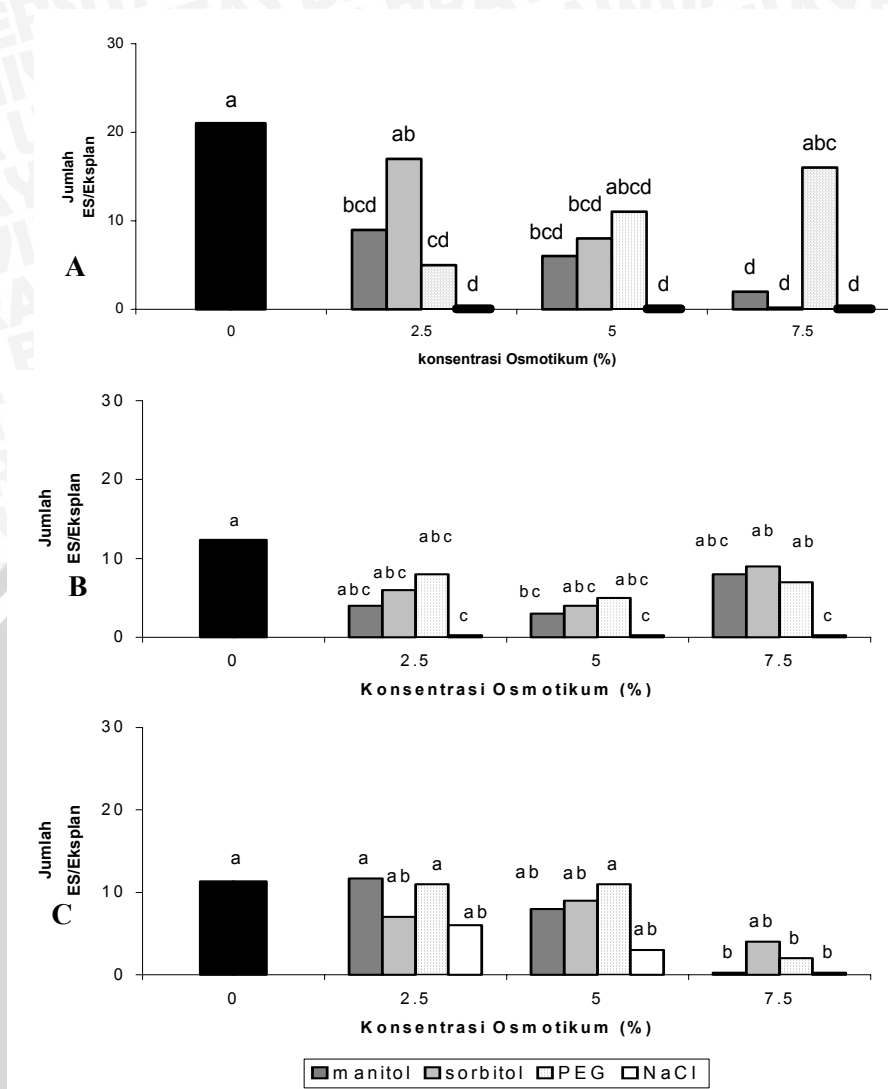
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Osmotikum pada Pembentukan ES dari 3 Genotip Kedelai

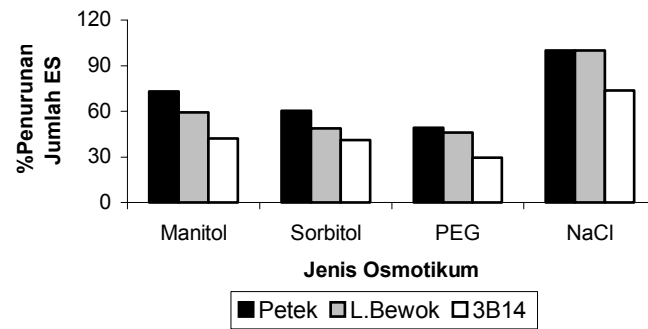
Penambahan osmotikum pada media induksi ES berpengaruh pada pembentukan ES tiap eksplan dari 3 genotip kedelai yang dikultur selama 30 hari. Eksplan ES yang terbentuk sebagian besar berwarna kuning.

Penambahan osmotikum menghambat pembentukan ES pada ketiga genotip Petek, Lumajang Bewok dan 3B14. Besarnya penghambatan pembentukan ES tergantung pada jenis dan konsentrasi osmotikum (Gambar 4.1). Penambahan manitol, sorbitol dan PEG mulai konsentrasi 2,5% menyebabkan penghambatan pembentukan ES pada genotip Petek. Jumlah ES tiap eksplan pada genotip Petek yang terbentuk pada media tanpa osmotikum (kontrol) sebesar 21 ES per eksplan, tetapi setelah penambahan osmotikum, ES yang terbentuk kurang dari 16 ES per eksplan. Sedangkan pada genotip 3B14 penghambatan pembentukan ES terjadi setelah penambahan manitol, sorbitol dan PEG konsentrasi 7,5%. Pembentukan ES genotip Lumajang Bewok juga mengalami penghambatan tetapi secara statistik tidak menunjukkan adanya beda nyata. Penambahan NaCl mulai konsentrasi 2,5% menyebabkan tidak terbentuknya ES pada genotip Petek dan Lumajang Bewok. Sedangkan penambahan NaCl konsentrasi 7,5% menyebabkan tidak terbentuknya ES pada genotip 3B14 (Gambar 4.1.). Eksplan yang ditanam pada media dengan penambahan NaCl selain tidak membentuk ES, eksplan menjadi berwarna kuning pucat dan akhirnya mati.

Selain osmotikum, genotip juga mempengaruhi pembentukan ES. Nilai persentase penurunan jumlah ES menunjukkan bahwa semakin besar persentase penurunan jumlah ES maka semakin besar pula kemampuan genotip dalam membentuk ES terhambat pada media dengan penambahan osmotikum. Kemampuan genotip Petek dalam membentuk ES paling terhambat dibandingkan dengan genotip yang lain, karena genotip Petek memiliki nilai persentase penurunan ES paling besar. Sebaliknya genotip 3B14 memiliki persentase penurunan jumlah ES paling kecil, sehingga kemampuan genotip 3B14 dalam membentuk ES tidak terhambat (Gambar 4.2).



Gambar 4.1. Pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum pada pembentukan ES dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan ada beda nyata pada jenis dan konsentrasi osmotikum



Gambar 4.2 Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap penghambatan pembentukan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji

Respon pembentukan ES kedelai terhadap penambahan osmotikum NaCl pada media induksi ES diduga disebabkan karena penambahan NaCl dengan konsentrasi yang kecil memiliki nilai potensial osmotik yang besar dibandingkan dengan osmotikum yang lain seperti manitol, sorbitol dan PEG (Lampiran 7). Oleh karena itu penambahan NaCl pada media ES menyebabkan penurunan potensial air yang cukup tinggi. Menurut Stasolla dkk. (2003), penurunan potensial air dalam media kultur dapat menyebabkan kebutuhan air sel tanaman bagi pembentukan ES yang optimal berkurang. Respon sel tanaman dalam mempertahankan kelangsungan hidupnya terhadap kondisi kehilangan air dalam sel adalah dengan menghindari kehilangan turgor dan penghentian pembentukan sel. Kehilangan turgor pada sel dapat diatasi dengan pengeluaran larutan di dalam vakuola ke luar lingkungan sel sehingga dapat menyebabkan meningkatnya potensial air (Fitter dan Hay, 1981). Menurut Greacen dan Oh (1972) pembentukan sel sangat sensitif terhadap kondisi kekurangan air. Hal tersebut dikarenakan ketika tekanan turgor berkurang terjadi pengurangan pembentukan sel yang nyata. Penghentian pembentukan sel pada kondisi sel kekurangan air terjadi diakibatkan karena adanya penggunaan hasil fotosintesis yang lebih besar untuk pemulihan sel pada saat kehilangan turgor dibandingkan untuk pembelahan sel dan kerusakan yang terjadi pada protein enzim karena konsentrasi ion yang relatif tinggi didalam sel (Reddy, dkk., 1997).

Perubahan warna dari hijau kekuningan menjadi kuning pucat pada ES yang dikultur pada media dengan penambahan NaCl disebabkan karena berkurangnya kandungan klorofil didalam sel. Menurut Hopskin dkk. (1999), potensial osmotik yang tinggi dari NaCl dapat menyebabkan stress osmotik sehingga dapat mengurangi kandungan klorofil dalam sel. Hasil penelitian Gibon (2000) yang menyatakan bahwa terjadi penurunan kandungan klorofil pada daun Canola yang mengalami stress osmotik. Karena potensial air yang sangat rendah menyebabkan inaktivasi enzim *chlorophyllase* yang berperan dalam pembentukan klorofil. Kandungan klorofil yang berkurang dalam sel dapat menghambat proses fotosintesis.

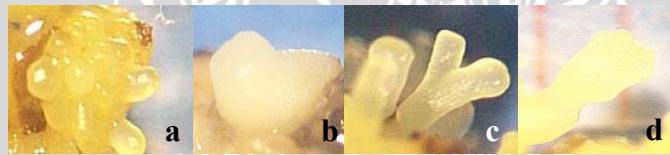
Penambahan manitol dan sorbitol dalam media induksi ES menyebabkan terhambatnya pembentukan ES karena diduga dapat menyebabkan plasmolisis. Menurut Attre dan fowke (1993), manitol dan sorbitol sebagai gula alkohol menyebabkan plasmolisis dimana molekul-molekul manitol dan sorbitol mampu melewati dinding sel dan menyebabkan plasmolisis sementara sampai pergerakannya menuju sitosol mengarahkan pada pemulihan sel. Oleh karena terjadinya plasmolisis sementara dalam sel maka pembentukan sel menjadi terhambat dan kegiatan sel dikonsentrasikan untuk pemulihan osmotik. Berdasarkan hasil penelitian Walker dan Parrot (2001), penambahan sorbitol 1,5% kedalam media induksi ES mampu mengurangi berat basah embrio somatik kedelai.

Penambahan PEG dalam media induksi ES juga menyebabkan penghambatan pembentukan ES. Pengaruh negatif PEG terhadap pembentukan ES diduga disebabkan oleh penurunan potensial air. Semakin besar konsentrasi PEG, maka semakin banyak air pada media kultur yang terikat sehingga ketersediaan air dalam media semakin berkurang. Kondisi kekurangan air ini dapat menghambat metabolisme sel sehingga menurunkan jumlah ES yang terbentuk. Hasil penelitian Kong dkk. (1998), menunjukkan bahwa penambahan agen osmotikum PEG pada media kultur *in vitro* menyebabkan terjadi penurunan proliferasi, pertumbuhan jaringan eksplan dan regenerasi tunas. Mekanisme penghambatan tersebut diduga terjadi karena cekaman akibat perlakuan PEG dapat menyebabkan perubahan kandungan poliamina endogen dalam jaringan eksplan. Kandungan poliamina telah diketahui berperan penting dalam pembentukan ES dari eksplan karet, wortel dan *Picea glauca* secara *in vitro*

Perbedaan respon dari ketiga genotip yang diuji tergantung pada faktor genetik yang mempengaruhi pembentukan ES. Genotip yang berbeda memiliki tingkat kompetensi yang berbeda pula dalam membentuk ES. Perbedaan tingkat kompetensi tersebut disebabkan karena faktor genetik dan kandungan hormon endogen pada tanaman (Bonacin dkk., 2000). Selain itu perbedaan kemampuan membentuk ES pada berbagai genotip kedelai dalam kultur in vitro terjadi akibat adanya perbedaan kualitas jaringan embrionik antar genotip (Bailey dkk., 1993).

4.2. Pengaruh Osmotikum pada Perkembangan ES dari 3 Genotip Kedelai

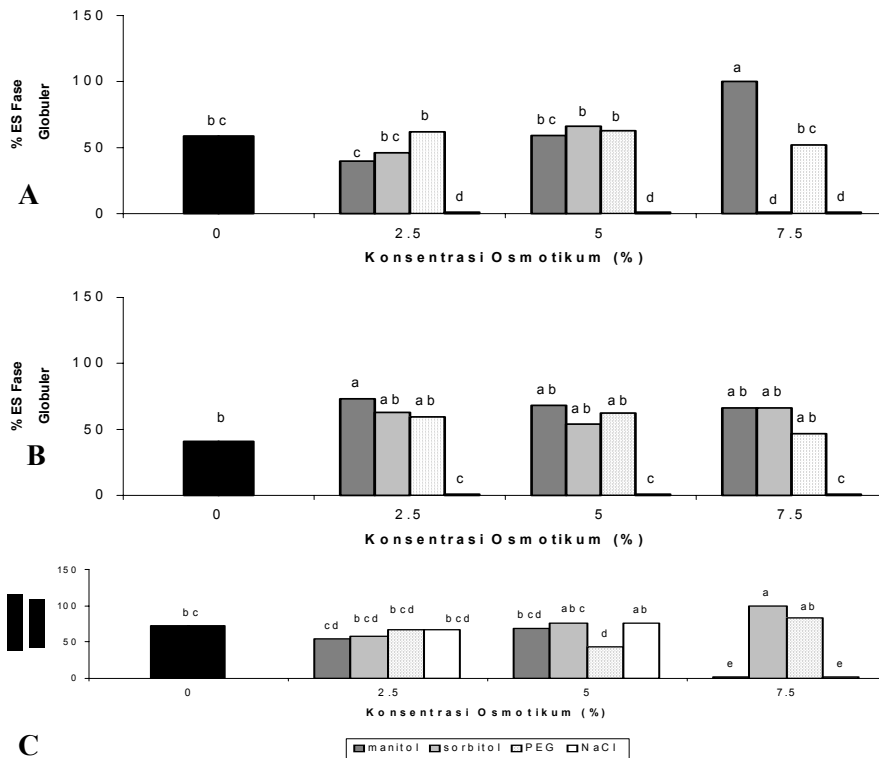
Perkembangan ES yang diamati meliputi fase globuler, hati, torpedo dan kotiledon. ES yang berbentuk bulat merupakan ES fase globuler (Gambar 4.3.a). Pada media tanpa osmotikum (kontrol), ES pada fase globuler paling banyak dijumpai dibandingkan dengan ES fase selanjutnya. Jumlah ES fase globuler yang terbentuk berkisar 41-59 %, akan berkembang menjadi ES yang berbentuk menyerupai hati yang disebut dengan ES fase hati (Gambar 4.3.b). Persentase terbentuknya ES fase hati relatif rendah yaitu dibawah 8 %. Fase perkembangan lebih lanjut dari ES fase hati merupakan ES fase torpedo yang berbentuk tabung panjang, dengan frekuensi terbentuknya sebesar 10-32 % (Gambar 4.3.c). Fase akhir dari ES adalah fase kotiledon (Gambar 4.3.d). Embrio somatik fase kotiledon memiliki struktur embrio paling lengkap dengan radikula. Persentase terbentuknya ES fase kotiledon yaitu dibawah 29%.



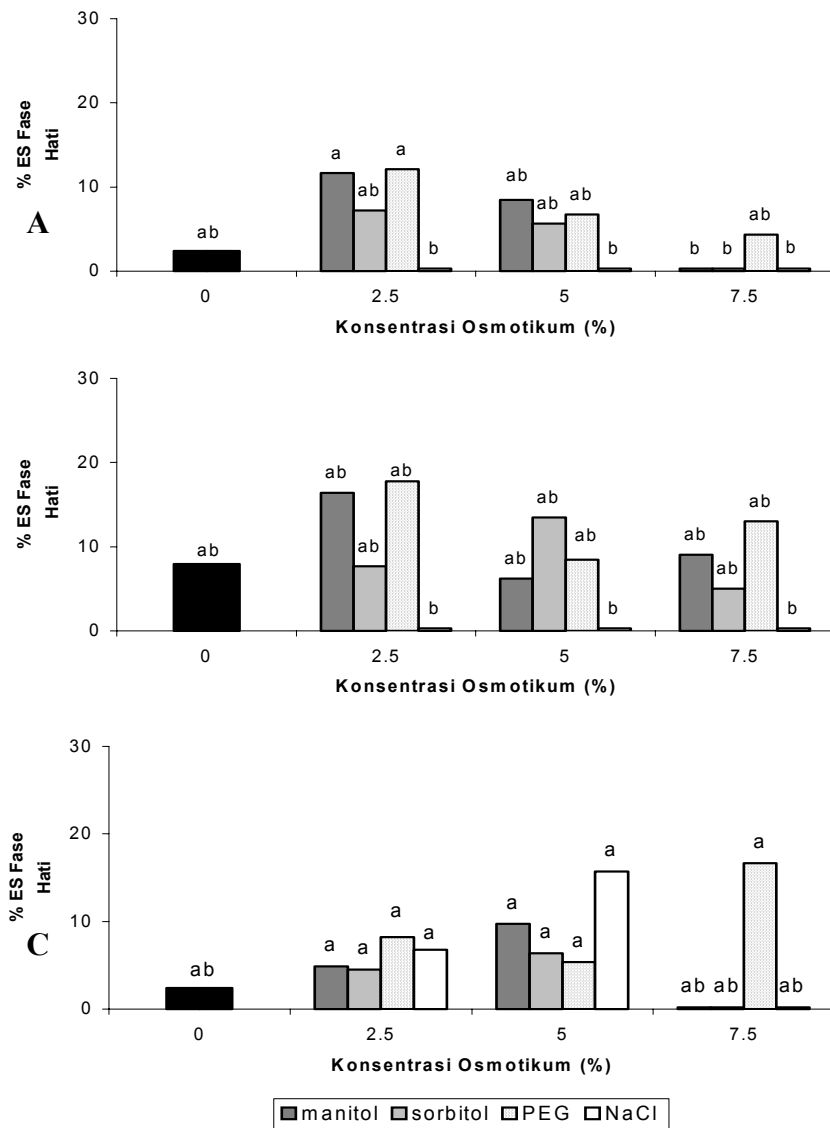
Gambar 4.3. Fase embrio somatik kedelai setelah dikultur selama 30 hari pada media induksi ES. a. globuler, b. hati, c. torpedo, d. Kotiledon

Hasil uji BNJ ($\alpha 0,05$) menunjukkan bahwa perkembangan ES fase globuler, hati dan torpedo tidak dipengaruhi oleh penambahan osmotikum manitol, sorbitol dan PEG pada 3 genotip yang diuji,

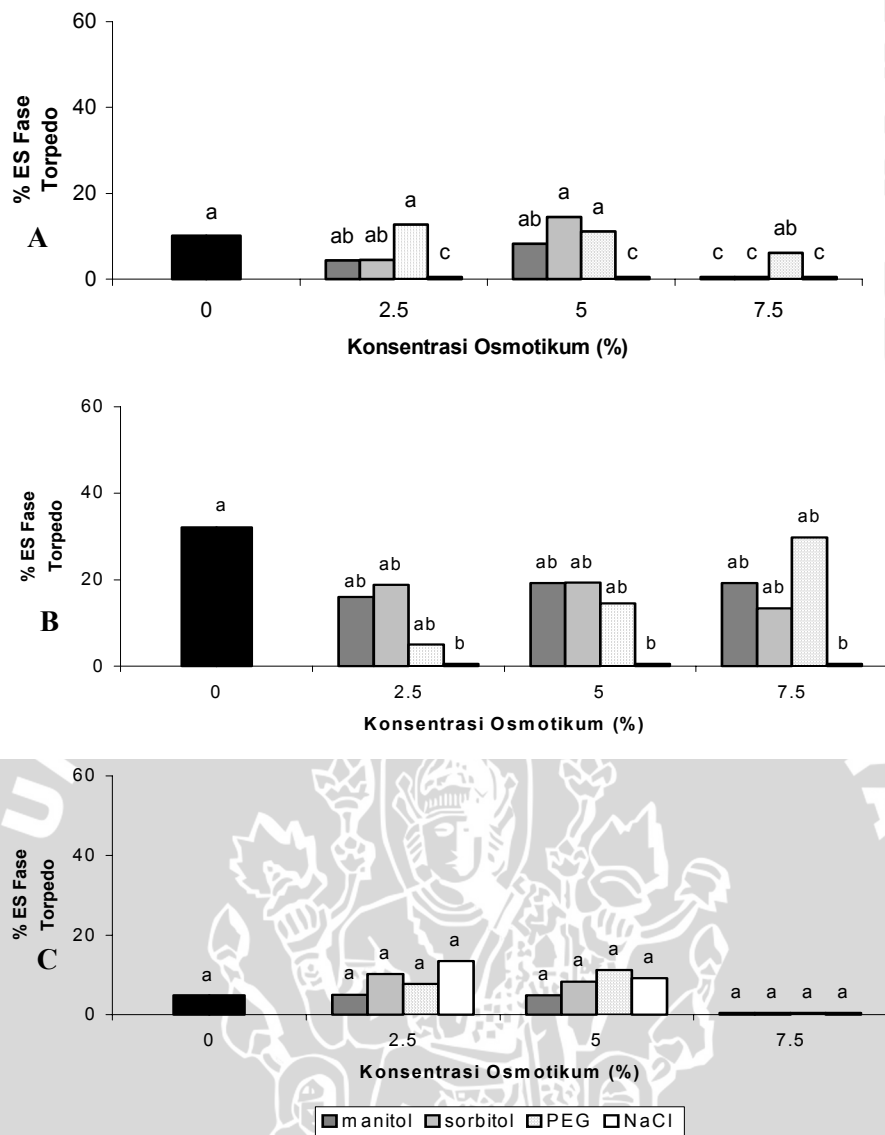
kecuali penambahan manitol dengan konsentrasi 7,5% mampu meningkatkan ES fase globuler pada genotip Petek yaitu dari 59% pada media tanpa osmotikum (kontrol) menjadi 100%. Sebaliknya penambahan manitol 2,5% menghambat perkembangan ES fase globuler mencapai 0% pada genotip 3B14 (Gambar 4.4, 4.5 dan 4.6).



Gambar 4.4. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase globuler dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata pada jenis osmotikum

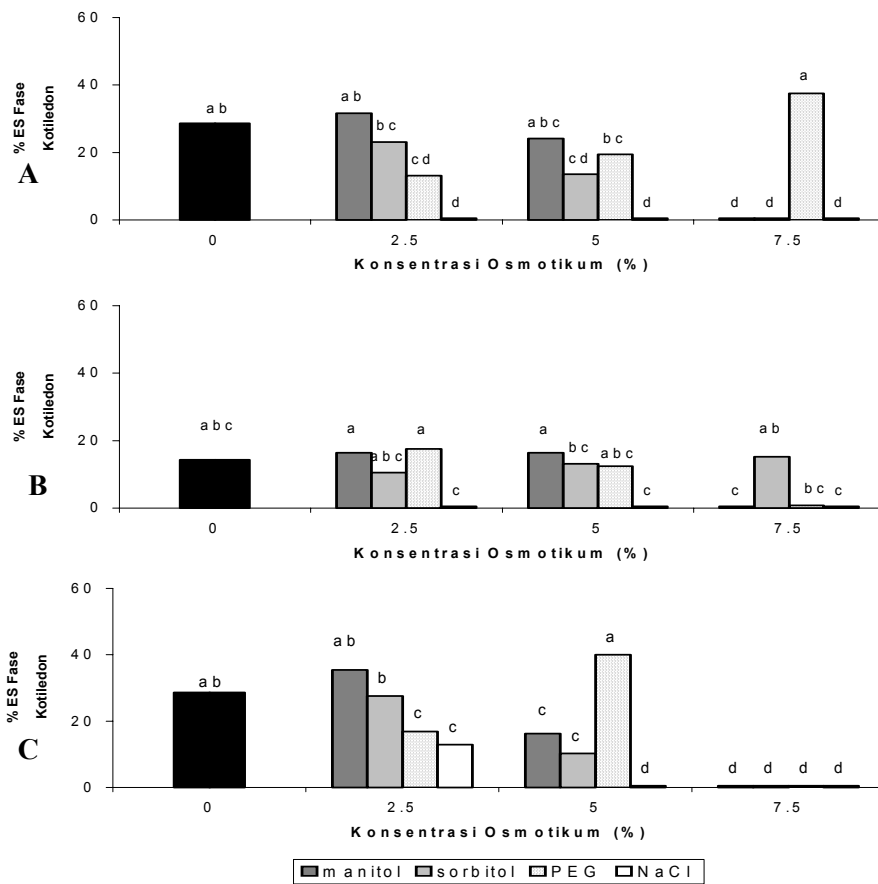


Gambar 4.5. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase hati dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata pada jenis osmotikum

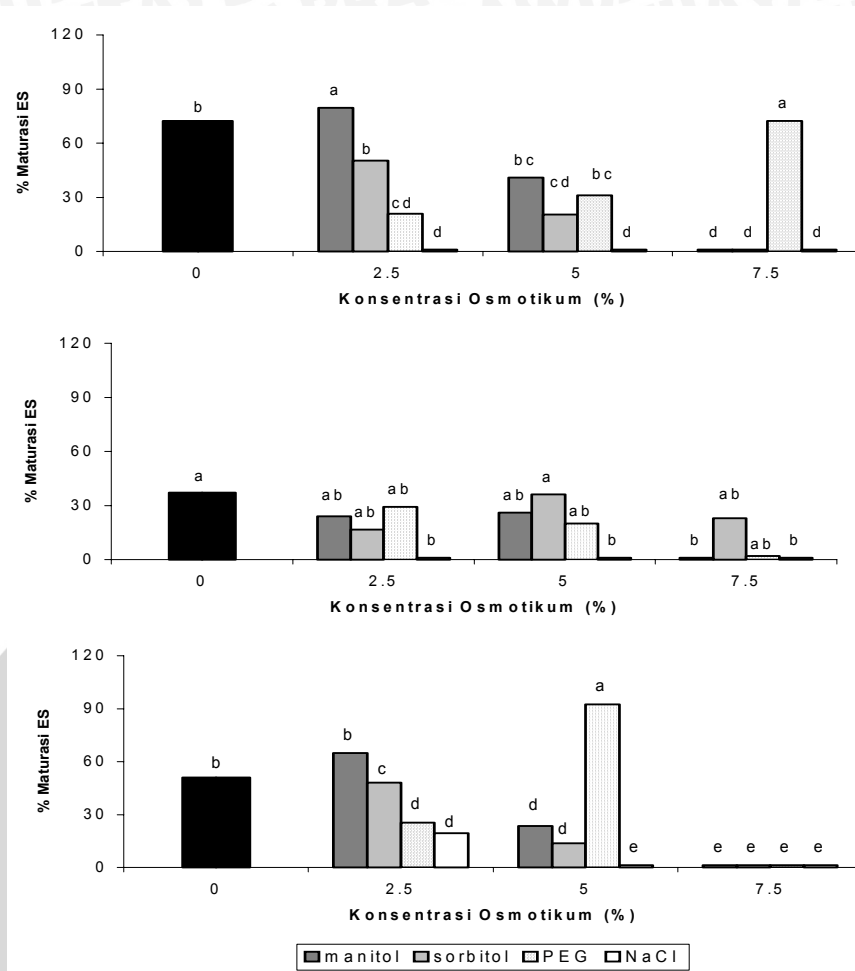


Gambar 4.6. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase torpedo dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata pada jenis osmotikum

Perkembangan ES fase kotiledon dan maturasi ES tidak dipengaruhi oleh penambahan manitol, sobitol dan PEG pada genotip Lumajang Bewok. Ketiga osmotikum tersebut pada konsentrasi 2,5% mampu menghambat maturasi ES pada genotip Petek. Sedangkan penambahan manitol dan sorbitol dengan konsentrasi 2,5% dapat memacu maturasi ES genotip 3B14 (Gambar 4.7 dan 4.8).



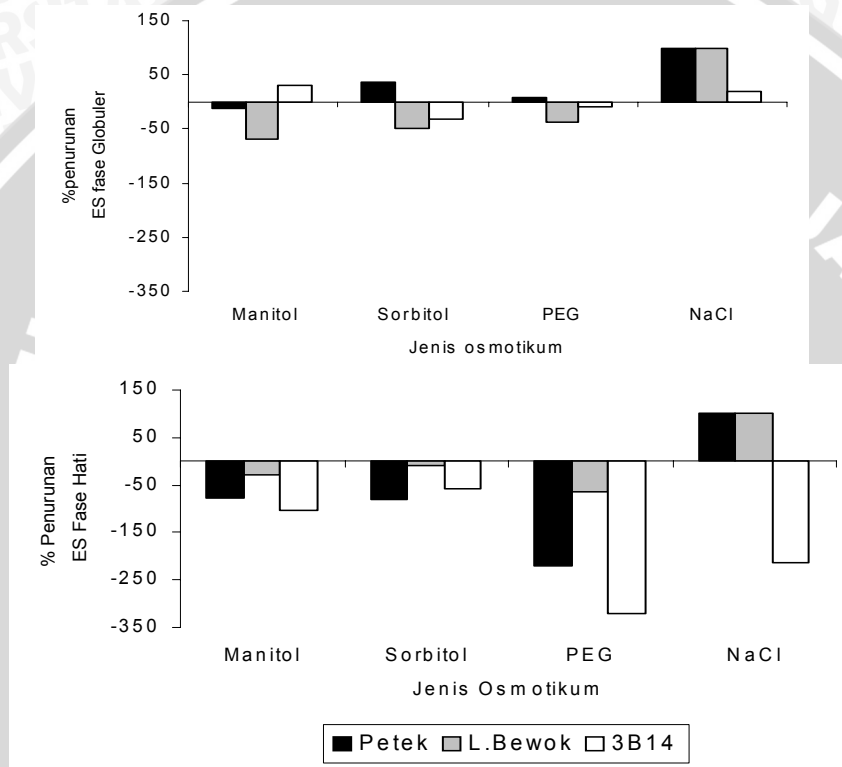
Gambar 4.7. Pengaruh osmotikum pada perkembangan ES fase kotiledon dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata pada jenis dan konsentrasi osmotikum



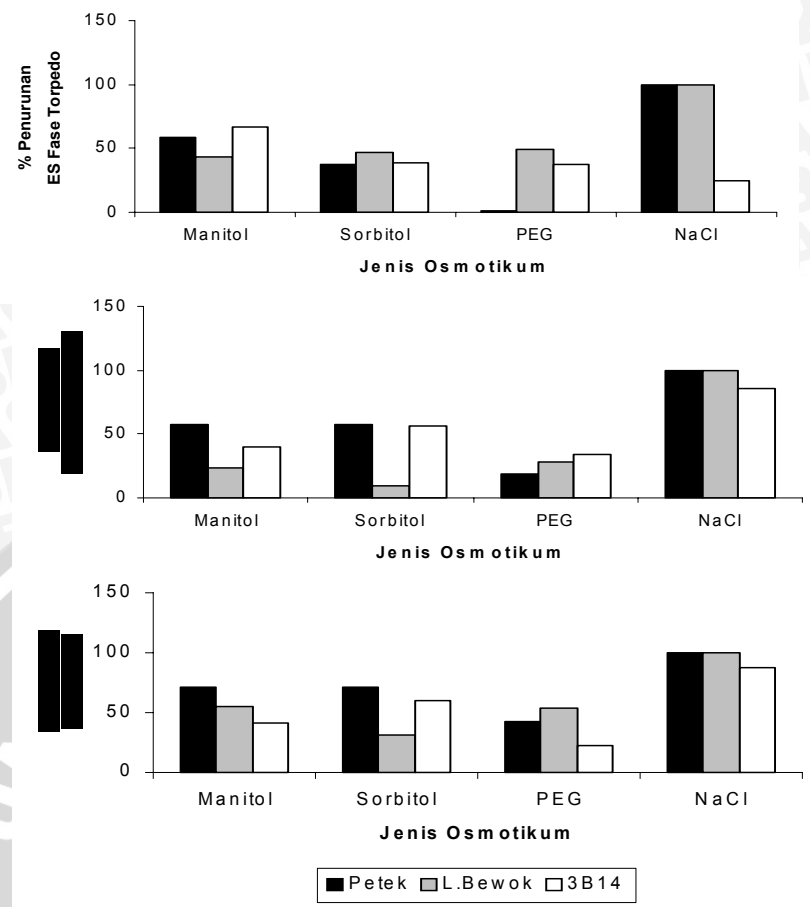
Gambar 4.8. Pengaruh osmotikum pada persentase maturasi ES dari 3 genotip kedelai. A. Petek, B. Lumajang Bewok dan C. 3B14. Ket: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata pada jenis dan konsentrasi osmotikum

Selain osmotikum, genotip juga mempengaruhi perkembangan ES. Persentase penurunan ES pada tiap fase berbeda pada 3 genotip yang diujikan. Pada ES fase globuler dan hati, nilai positif dari persentase penurunan ES menunjukkan penghambatan perkembangan ES, sedangkan nilai negatif dari persentase penurunan

ES menunjukkan peningkatan perkembangan ES. Kemampuan genotip Lumajang Bewok meningkat pada perkembangan ES fase globuler. Sedangkan kemampuan genotip 3B14 dalam berkembang menjadi ES fase hati meningkat (Gambar 4.9). Nilai persentase penurunan ES fase torpedo, kotiledon dan maturasi ES menunjukkan bahwa semakin besar persentase penurunan jumlah ES fase torpedo, kotiledon dan maturasi ES maka semakin besar pula kemampuan genotip mengalami penghambatan pada perkembangan ES fase torpedo, kotiledon dan maturasi ES. Kemampuan genotip Lumajang bewok dalam berkembang menjadi ES fase torpedo, kotiledon dan maturasi lebih besar mengalami penghambatan dibandingkan dengan genotip lainnya, sebab genotip Lumajang Bewok memiliki nilai persentase penurunan ES paling besar (Gambar 4.10).



Gambar 4.9. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase globuler dan hati pada 3 genotip kedelai yang diuji



Gambar 4.10. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase torpedo dan kotiledon serta maturasi ES pada 3 genotip kedelai yang diuji

Menurut Fernando dkk. (2003), ES dalam tahapan globuler muncul dari pembelahan sel-sel sub epidermal yang tersusun atas sel meristematis. Fase globuler berkembang menjadi ES yang berbentuk hati. Embrio somatik fase hati merupakan ES yang berbentuk simetris bilateral dan berukuran lebih besar dari fase globular. Fase selanjutnya berupa tonjolan memanjang yang disebut fase torpedo.

Menurut hasil penelitian Agustina (2005), pada umumnya ES fase kotiledon normal berbentuk tabung dengan bagian ujung kotiledon bercabang dua. Selain itu juga didapatkan beberapa bentukan kotiledon yang berbeda seperti gada, kipas dan mangkok .

Dari hasil penelitian ini penambahan larutan osmotikum seperti manitol, sorbitol dan PEG pada media induksi ES tidak berpengaruh pada perkembangan ES fase globuler, hati dan torpedo. Hal tersebut berbeda dengan pernyataan Santoso (2003) dan Mckersie (1997) salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan perkembangan ES adalah tekanan osmotik di dalam media. Pemberian osmotikum dengan konsentrasi yang tepat pada media mampu menjaga tekanan osmotik di dalam maupun di luar sel, sehingga mampu mendukung perkembangan ES pada sebagian tanaman. Berdasarkan penelitian Gupta (1995) pemberian osmotikum yang berlebihan pada tanaman menyebabkan stress kekeringan. Sebagian tanaman memberikan respon stress kekeringan dengan cara menyelesaikan siklus hidupnya lebih cepat.

Dalam penelitian ini penambahan osmotikum pada media induksi ES menyebabkan penghambatan perkembangan ES fase maturasi. Hal tersebut bertolak belakang dengan penelitian Stasolla dkk. (2003) yang menyatakan bahwa penambahan osmotikum dapat meningkatkan maturasi ES pada *White Spruce*. Kekurangan air yang disebabkan oleh penambahan osmotikum menyebabkan akumulasi prolin. Menurut Gardner (1991), apabila sel mengalami kekurangan air secara terus-menerus dapat menyebabkan aktifitas enzim protease meningkat. Jika enzim protease semakin aktif, maka akumulasi prolin semakin tinggi, sehingga menstimulus sintesis ABA endogen yang berkorelasi dengan peningkatan sintesis protein cadangan yang merupakan karakteristik maturasi ES. Hasil penelitian Finkelstein dkk. (1986) menunjukkan bahwa kandungan ABA endogen yang tinggi menghambat perkecambahan. Pada fase perkembangan akhir, kondisi sedikit osmotik diperlukan untuk menjaga embrio dari pengambilan air dan perkecambahan. Proses penghambatan pengambilan air tersebut disebut sebagai proses desikasi yang merupakan bagian penting dalam proses maturasi.

Fase maturasi ES sangat penting dalam regenerasi tanaman. Fase maturasi diperlukan untuk mencegah perkecambahan awal. Perkecambahan awal pada embrio immatur menyebabkan perkembangan abnormal yang memproduksi planlet yang lemah.

Kemampuan perkembangan ES selain dipengaruhi oleh penambahan osmotikum juga dipengaruhi oleh genotip yang digunakan. Bhojwani (1990) dan Widoretno, dkk. (2003), menyatakan bahwa faktor genetik diduga berperan dalam mengontrol kemampuan eksplan dalam regenerasi dan pembentukan ES. Kontrol tersebut merupakan hasil dari sejumlah kecil gen yang diturunkan dan diseleksi. Selain kemampuan regenerasi, genotip juga berpengaruh terhadap beberapa fase untuk mengkonversi ES dan perkecambahan ES menjadi tanaman lengkap (Hernandez dkk., 2003).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Penambahan osmotikum menghambat pembentukan ES pada ketiga genotip Petek, Lumajang Bewok dan 3B14. Penambahan NaCl dengan berbagai konsentrasi yang diuji cenderung lebih menghambat pembentukan ES dibandingkan dengan osmotikum lainnya. Selain menghambat, NaCl juga menyebabkan kematian eksplan yang ditanam. Pada perkembangan ES, penambahan manitol dan sorbitol 2,5% cenderung lebih efisien meningkatkan perkembangan ES dalam maturasi dibandingkan dengan osmotikum yang lain.

Selain jenis dan konsentrasi osmotikum, respon pembentukan dan perkembangan ES pada media penambahan osmotikum juga dipengaruhi genotip kedelai yang diuji. Pembentukan ES genotip Petek pada media penambahan osmotikum cenderung lebih terhambat dibandingkan 2 genotip yang lain. Sedangkan perkembangan ES fase hati genotip 3B14 meningkat.

5.2. Saran

Untuk mengetahui kualitas ES yang terbentuk, maka perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap kemampuan regenerasi ES dalam membentuk planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, H., W. Widoretno dan R. Mastuti. 2005. Pengaruh Asam Amino Pada Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Somatik Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr). Tugas Akhir Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya
- Allard, R.W. 1960. Principle of Plant Breeding. John and Willey Sons. New York. Hal 29-33
- Attree S.M. dan L.C. Fowke. 1993. Embryogeny of Gymnosperms: Advances in Synthetic Seed Technology of Conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culur*. 35: 1–35
- Attree, S.M., D. Moore, V.R. Sawhney dan L.C. Fowke. 1991. Enhanced Maturation and Desiccation Tolerance of White Spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss) Somatic Embryos: Effects of a non-Plasmolysing Water Stress and Absciscic Acid. *Ann. Bot.* 68: 519–525
- Bailey, M.A., H.R. Boerma dan W.A. Parrot. 1993. Genotype effect on proliferative Embryogenesis and Plant Regeneration Of Soybean. *In vitro Cell.Dev.Biol.* 29: 102-108
- Bajaj Y.P.S. 1994. Biotechnological Applications of Plant Culture. Somatic Embryogenesis and artificial Seeds. Springer-Verlag. Berlin. Hal 53-79
- Barwale, U.B., H.A. Kern dan J.M. Widholm. 1986. Plant Regeneration from Callus Culture of Several Soybean Genotypes Via Embryogenesis and Organogenesis. *Planta* 167:473-480
- Barwale, U.B dan J.M. Widholm. 1990. Soybean: Plant Regeneration and Somaclonal Variation. Dalam Y.P.S. Bajaj (Ed). Biotechnology in Agricultural and Forestry. Vol 10. Legumes & Oil Seed Crop 1. Springer-Verlag Heidelberg. Berlin

- Bewley, J.D. dan M. Black. 1994. *Seeds : Physiology of Development and Germination*. Second Edition. Plenum Press. New York. Hal 183-256
- Bhojwani, S.S. 1990. *Plant Tissue Culture: Application and Limitation*. Elsevier. New York 4: 67-101
- Blum, A. 1988. Use of PEG to Induce and Control Plant Water Deficit in Experimentak Hydroponics Culture. <http://www.planstress.com/admin/Files/PEG.htm>. Tanggal akses 3 Juli 2004
- Bonacin, G.A., A.O. Di Mauro, R.C. De Oliveira dan D. Perecin. 2000. Induction of Somatic Embryogenesis in Soybean : Phiso Chemical Factors Influencing Development of Somatic Embryos. *Genet. Mol. Biol.* 23: 865-868
- Campbell, N.A., J.B. Reece dan L.G. Mitchell. 1999. *Biologi*. Alih bahasa W. Manalu. Erlangga. Jakarta. Hal 320-322
- Chawla, H.S. 2003. *Plant Biotechnology A Pratical Approach*. Science Publisher, Inc.. *Micropropagation-Embryogenesis* 11:81
- Departemen Pertanian. 2001. Upaya Bangkit Kedelai. <http://www.depattan.go.id/ditjntp/KabiOk/Bangkit%2001.htm> Tanggal akses 15 Juni 2005
- Dragiiska, R., D. Djilianov, D. Dhenchev dan A. Atanassov. 1996. In Vitro Selection for Osmotic Tolerance in Alfafa (*Medicago sativa*). *Plant Physiol* 22(3-4):30-39
- D'Onofrio dan S. Morini. 2002. Increasing NaCl and CaCl₂ Concentration in The growth Medium of Quince Leaves: Effects on Somatic Embryo and Root Regeneration. *In Vitro Cell. Dev.* 38: 366-377
- Evans, D.E., J D.O. Coleman dan A. Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. Bioscientific Publisers. London. Hal 7-18

- Fernando, J.A., M.L.C. Vieira, I.O. Geraldi dan B. Appezzoeo-da-Gloria. 2002. Anatomical study of Somatic Embryogenesis in Glycine max (L.) Merrill. *Brazilian Archive of Biology and Technology: An International Journal*. 54(3):277-286
- Finer, J.J. dan M.D. Mc Mullen. 1991. Transformation of Soybean via Particle Bombardment of Embryogenic Suspension Culture Tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:175-182
- Finkelstein, R. Ruth dan L. C. Martha. 1986. Rapeseed Embryo Development in Culture on High Osmoticum is Similar to That in Seeds. *Plant Physiol* 81: 907-912
- Fitter, A. H. dan R. K. M. Hay. 1981. Fisiologi Lingkungan Tanaman. Penerjemah: Ir. Sri Andani dan Ir. E.D. Purbayanti. Gajahmada University Press. Yogyakarta. Hal 34-37
- Franklin, G., L. Carpenter, E. Davis, C.S. Reddy, D. Al-Abed, W.A. Alaiwi, M. Parani, B. Smith, S.L. Goldman, dan R.V. Sairam. 2004. Factors Influencing Regeneration of Soybean from Mature and Immature Cotyledons. *Plant Growth Regul.* 43:73-79
- Gibon, Y., R. Sulpice dan F. Laiher. 2000. Prolin Accumulation in Canola Leaf Disc Subjected to Osmotic Stress is Related to the Lost of Chlorophylls and to the Decrease of Mitichondrial Activity. *Planta* 110: 469-476
- Greacen, E.L. dan J.S. Oh. 1972. Physycs of Root Growth. *Nature New Biology*. 235, 24-25
- Gupta, U.S. 1995. Production and Improvement of Crops for Drylands. Science Publisher Inc. Hal 168-169
- Hernandez I, C. Celestino, J. Alegree dan M. Toritio. 2003. Vegetative Propagation of Quercus ruber L. By Somatic Embryogenesis II. *Plant Cell Rep.* 21 (8): 765-770

Hopkins, W.G. 1999. Introduction to Plant Physiology, 2nd Edition. John Willey and Son, Inc. New york. Hal 23-36

Jusuf, M., A. Kasno., D. Sopandie., E.D.J. Supena., U.Widyastuti., Miftahudin., Hamim dan Supijatno. 1993. Evaluasi Plasma Nutfah Kedelai untuk Lahan Kering atau ber-pH rendah Serta Berkualitas Nutrisi Baik. FMIPA, IPB. Bogor

Karkonen, Anna. 2001. Plant Tissue Cultures as Models For Free Physiology: Somatic Embryogenesis of *Tilia cordata* and Lignin Biosynthesis in *Picea abies* suspension culture as case studies. *Academic dissertation*. University of Helsinki

Komatsuda, T., W. Ginlee dan S. Oka. 1992. Maturation and Germination of Embryogenesis Somatic as Effected By Sucrose and Plant Growth Regulation in Soybeans *Glycine gracilis* and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur* 28: 103-113

Kong, L., S.M. Atree dan L.C. Fowke. 1998. Effect of Polyethylene Glycol and Methylglyoxal bis (Guanylhydrazone) on Endegeonus Polyamine Levels and Somatic Embryo Maturation in White Spruce (*Picea glauca*). *Plant Science*. 133:211-220

Lippmann, B dan G. Lippmann. 1999. Soybean Embryo Culture: Factors Influencing Plant Recovery from Isolated Embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 83-90

Litz, R.E dan D.J. Gray. 1992. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. Dalam F.A. Hammerschlog dan R.E. Litz. Biotechnology of Perennial Fruit Crop. C. A. B. International. Cambridge. Hal 3-34

Mckersie, D.D. dan D.C.W. Brown. 1997. Biotechnology and improvement of Forage Legumes. CAB International. UK

Mckersie, B.D. T. Senaratna, S.R. Bowley. 1990. Drying somatic embryos for use as artificial seeds. In Proceedings of the Plant Growth Regulator Society
www.plant.uoguelph.ca/research/embryo/synseeds.htm - 39k

Merkele, S.A., W.A. Parrot dan E.G. Williams. 1990. Application of Somatic Embryogenesis and Embryo Cloning. Dalam S.S. Bhojwani (Ed). Plant Tissue Culture: Application and Limitation. Elsevier Science Ltd. Oxford. Hal 67-101

Mexal J., Fisher JT, Osteryoung J., Patrick Reid CP. 1974. Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions and Its Implication in Plant Water Relation. *Plant Physiol.* 55:914-916

Mhaske V.B., K. Chengalrayan dan S. Hazra. 1998. Influence of Osmotica and Absciscic Acid on Triglyceride Accumulation in Peanut Somatic Embryos. *Plant Cell Rep.* 17: 742-746

Mhoing A., F. Carbone, M.H. Rashad, and Gaudillere. 1992. Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiol.* 100: 1878-1884

Najiyati, S. dan Danarti. 1999. Pemanfatan Lahan Tidur untuk Tanaman Pangan. Penerbit Swadaya. Jakarta

Pardal S. J., T.I.R. Utami dan M. Herman. 2002. Organogenesis dan Embriogenesis Somatik Kedelai Secara *In Vitro*. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor

Parrot, W. A., A.G. Williams, D.F. Hildebrand dan G.B.Collins. 1989. Effect Of Genotype On Somatic Embryogenesis From Immature Cotyledons Of Soybeans. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur* 16: 15-21

Pesquire, J., M.D. Garcia, S. Saltari, M.C. Morina. 2006. NaCl effect in *Zea mays* L. x *Tripsacum dactyloides* (L.) Hibrid Cally and Plants. *Electronis Journal of Biotechnology* 9: 3-18

Poespodarsono, S. 1985. Dasar-Dasarr Ilmu Pemuliaan Tanaman. Pusat Antar Universitas Unstitut Pertanian Bogor. Bogor

Prem, A.R., A. Ganapathi, R. Anbazhagan, G. Vengadesan dan Selvaraj. 2000. High Frequency Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Cell Suspension Cultures of Cowpea, *Vigna Unguilata (L.) Walp. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 36:475-480

Raemakers, C.J.J.M., E. Jacobsen dan R.G.F. Visser. 1995. Secondary Somatic Embryogenesis and Application in Plant Breeding. *Euphytica*. 81:93-107

Rajashekar, G., D. Palmquist dan C.A. Ledbetter. 1995. *in Vitro* Screening Procedure for Osmotic Tolerance in *Prunus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41:154-164

Reddy, M.P., U.S. Rao dan E.R.R. Iyengar. 1997. Carbon Metabolism Under the Salt Stress. Dalam P.K. Jaiwal, R.P. Singh dan A. Gulati (Ed.). Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plant. Science Publishers, Inc. USA. Hal 159-190

Reichert, N.A., M.M. Young, dan A.L. Woods. 2003. Adventitious Organogenic Regeneration from Soybean Genotypes Representing Nine Maturity Groups. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur* 75:273-277

Sairam, R.V., G. Franklin, R. Hassel, B. Smith, K. Meeker, N. Kashikar, M. Parani, D. Al. Abed, S. Ismail, K. Berry, dan S.L. Goldman. 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 Cultur*. 75:79-85

Santoso,U. dan Nursandi F. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. UMM Press. Malang

Skriver, K. dan J. Munday. Gene Expression in Response to Absisic Acid and Osmotic Stress. *Plant Cell* 2: 503-512

Smith, R.H. 2000. Plant Tissue Culture Techniques and Experimental, Second Edition. Academic Press. London. *Somatic Embryogenesis* : 111-112

Stasolla, C., E.C. Yeung, T. A. Thorpe. 2003. Somatic Embryogenesis in White Spruce: Physiology and Biochemistry at S.S. Bhojwani and Woong Young Soh. *Agrobiotechnology and Plant Tissue Culture*. Science Publishers, Inc. Hal 7-24

Suhartina. 2003. Perkembangan dan Deskripsi Varietas Unggul Kedelai 1918-2002. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan umbi-umbian. Malang. 72 hal

Sumarno. 1995. Pemuliaan Tanaman Kacang-Kacangan. Balai Penelitian Tanaman Pangan Malang

Tang, H., Z. Rend dan G. Krezal. 2000. Somatic Embryogenesis and Organogenesis from Immature Cotyledons of Three Sour Cherry Cultivar (*Prunus cerasus* L.). *Scientia Holticurlture*. 83:10126

Terzi, M. dan F. Laschiavo. 1991. Somatic Embryogenesis dalam S.S. Bhojwani (Ed). *Plant Tissue Culture: Aplication and limitation*. Elsevier Science Ltd. Oxford. Hal 54-61

Te-chato, S dan O.U. Rungnoi. 2001. Induction of Somatic Embryogenesis from Leaves of Sadao Chang (*Azadirochta excelsa* (Jack)Jacobs). *Scientia Horticulturae*. 86: 311-32

Ul-Hug dan Y. Zafar. 2004. Effect Of Nitrates On Embryo Induction Efficiency In Cotton (*Gossypium hirsatum* L.). *African Journal of Biotechnology* 3: 319-323

Vookava, B. dan A. Kormutak. 2002 Some Features of Somatic Embryo Maturation of Algerian Fir. *In Vitro Cell. Dev.* 38: 549-551

Wardiani, R.D. W. Widoretno dan R. Mastuti. 2004. Skrining In Vitro untuk Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan dengan Menggunakan PEG Pada Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max*) Daya Hasil Rendah. Tugas Akhir Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Malang

Warren, G. 1993. The Regeneration of Plants from Cultured Cells and Tissues. Dalam A.Stafford dan G. Warren. Plant Cell and Tissue Culture. John Willey & Sons. Chicester

Widoretno, W., E.Guhardja, S. Ilyas dan Sudarsono. 2002. Efektivitas Polyethylena Glycol untuk Mengevaluasi Tanggapan Genotipe Kedelai terhadap Cekaman Kekeringan pada Fase Perkecambahan. *Hayati*. 9: 33-36

Widoretno, W., E.L. Arumningtyas, dan Sudarsono. 2003. Metode Induksi Pembentukan Embrio Somatik dari Kotiledon dan Regenerasi Planlet Kedelai Secara *In Vitro*. *Hayati*:19-24



Lampiran 1. Komposisi Makronutrien dan Mikronutrien MS (Murashige & Skoog 1962) Serta Vitamin B5 (Gemborg,1968)

Nama Bahan	Berat (mg/L)
<u>Makronutrien</u>	
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
<u>Mikronutrien</u>	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,3
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
<u>Vitamin B5</u>	
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxin HCl	0,5
Thiamin HCl	1
Glycine	2
MyoInositol	100

+

Lampiran 2. Komposisi Larutan Stok Media MS, Vitamin B5 dan Zat Pengatur Tumbuh (Zpt)

Larutan Stok	Nama Bahan	Berat untuk 100 ml (g)	Pengambilan untuk 1 L. Media (ml)
A (5x)	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	8.25	20
B (5x)	KNO_3	9.50	20
C (10x)	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4.40	10
D (10x)	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.70	10
	KH_2PO_4	1.70	
E (20x)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.56	5
	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.75	
		0.12	
F (20x)	H_3BO_3	0.34	5
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.17	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	
G (200x)	KI	0.05	0.5
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05	
Vitamin B5	Nicotinic Acid	0.05	1
	Pyridoxin HCl	0.05	
	Thiamin	0.01	
	Glycine	0.20	
Myoino (10x)	Myoinositol	1.00	10
Zpt	Auksin (2,4-D, NAA)	0.10	1 ml untuk 1 ppm

Lampiran 3. Hasil analisa data dengan uji BNJ pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum serta genotip pada pembentukan dan perkembangan embrio somatik (ES) kedelai

▪ Pembentukan ES Kedelai

a. ES per Eksplan

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	3.989	2	1.995	.192	.825
genotip	210.868	2	105.434	10.168	.000
Osmotikum	955.219	3	318.406	30.706	.000
konsentrasi	42.022	2	21.011	2.026	.140
Genotip*Osmotikum	204.255	6	34.042	3.283	.007
Genotip*konsentrasi	279.730	4	69.933	6.744	.000
Osmotikum*konsentrasi	94.261	6	15.710	1.515	.187
Genotip*Osmotikum*konsentrasi	328.942	10	32.894	3.172	.002
Galat	674.011	65	10.369		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

▪ Perkembangan ES Kedelai

a. Fase Globuler

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	82.522	2	41.261	1.299	.280
genotip	577.835	2	288.917	9.095	.000
Osmotikum	2810.951	3	936.984	29.496	.000
konsentrasi	35.222	2	17.611	.554	.577
Genotip*Osmotikum	487.188	6	81.198	2.556	.028
Genotip*konsentrasi	753.297	4	188.324	5.928	.000
Osmotikum*konsentrasi	97.492	6	16.249	.512	.797
Genotip*Osmotikum*konsentrasi	684.459	10	68.446	2.155	.032
Galat	2064.812	65	31.766		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

b. Fase Hati

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	.846	2	.423	.296	.745
genotip	2.810	2	1.405	.984	.379
Osmotikum	49.337	3	16.446	11.517	.000
konsentrasi	9.789	2	4.895	3.428	.038
Genotip*Osmotikum	14.088	6	2.348	1.644	.149
Genotip*konsentrasi	15.625	4	3.906	2.736	.036
Osmotikum* konsentrasi	5.356	6	.893	.625	.709
Genotip*Osmotikum* konsentrasi	18.680	10	1.868	1.308	.245
Galat	92.821	65	1.428		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

c. Fase Torpedo

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	2.040	2	1.020	.319	.728
genotip	88.039	2	44.020	13.770	.000
Osmotikum	93.373	3	31.124	9.736	.000
konsentrasi	.193	2	.096	.030	.970
Genotip*Osmotikum	26.932	6	4.489	1.404	.227
Genotip*konsentrasi	71.348	4	17.837	5.580	.001
Osmotikum* konsentrasi	10.841	6	1.807	.565	.756
Genotip*Osmotikum* konsentrasi	32.409	10	3.241	1.014	.442
Galat	207.793	65	3.197		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

d. Fase Kotiledon

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	2.716	2	1.358	.230	.795
Genotip	490.889	2	245.444	41.507	.000
Osmotikum	438.648	3	146.216	24.727	.000
Konsentrasi	54.883	2	27.442	4.641	.013
Genotip*Osmotikum	161.834	6	26.972	4.561	.001
Genotip*konsentrasi	251.758	4	62.940	10.644	.000
Osmotikum* konsentrasi	284.957	6	47.493	8.032	.000
Genotip*Osmotikum* konsentrasi	481.409	10	48.141	8.141	.000
Galat	378.450	64	5.913		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

e. Persentase Pematangan ES Kedelai

SK	JK	db	KT	F hitung	Sig ¹
Kelompok	38.670	2	19.335	.385	.682
Genotip	3545.380	2	1772.690	35.332	.000
Osmotikum	14097.760	3	4699.253	93.663	.000
Konsentrasi	5992.415	2	2996.208	59.719	.000
Genotip*Osmotikum	3419.480	6	569.913	11.359	.000
Genotip*konsentrasi	5579.625	4	1394.906	27.803	.000
Osmotikum* konsentrasi	10826.088	6	1804.348	35.963	.000
Genotip*Osmotikum* konsentrasi	14254.850	10	1425.485	28.412	.000
Galat	3160.833	63	50.172		

¹ signifikan jika nilai kurang dari 0.05

Lampiran 4. Pengaruh jenis dan konsentrasi osmotikum pada pembentukan dan perkembangan ES dari 3 genotip kedelai.

genotip	perlakuan	[] %	ES/ Eksplan	% Globuler	% Hati	% Torpedo	% Kotiledon	% Maturasi
Petek	kontrol		21 a	58.9 bc	2.4 ab	10.1 a	28.7 ab	72.2 b
	manitol	2.5	9 bcd	39.7 c	11.6 a	4.3 ab	31.69 ab	79.6 a
		5	6 bcd	59.1 bc	8.5 ab	8.3 ab	24.2 abc	41.1 bc
		7.5	2 d	100 a	0 b	0 c	0 d	0 d
	sorbitol	2.5	17 ab	45.9 bc	7.2 ab	4.4 ab	23.1 bc	40.43 b
		5	8 bcd	66.2 b	5.7 ab	14.5 a	13.7 cd	20.5 cd
		7.5	0 d	0 d	0 b	0 c	0 d	0 d
	PEG	2.5	5 cd	62 b	12.1 a	12.8 a	13.2 cd	21 cd
		5	11 abcd	62.7 b	6.7 ab	11.1 a	19.5 bc	31.2 bc
		7.5	16 abc	52 bc	4.3 ab	6.1 ab	37.6 a	72 a
	NaCl	2.5	0 d	0 d	0 b	0 c	0 d	0 d
		5	0 d	0 d	0 b	0 c	0 d	0 d
		7.5	0 d	0 d	0 b	0 c	0 d	0 d
L.Bewok	kontrol		12.33 a	41 b	8 ab	32.1 a	14.3 abc	37 a
	manitol	2.5	4 abc	73.2 a	16 ab	16 ab	16.4 a	24 ab
		5	3 bc	68.1 ab	6.2 ab	19.2 ab	16.4 a	26 ab
		7.5	8 abc	66.4 ab	9 ab	19.2 ab	0 c	0 b
	sorbitol	2.5	6 abc	62.9 ab	7.7 ab	18.9 ab	10.6 abc	17 ab
		5	4 abc	54 ab	13.5 ab	19.3 ab	13.2 bc	36 a
		7.5	9 ab	66.3 ab	5 ab	13.3 ab	15.3 ab	23 ab
	PEG	2.5	8 abc	59.7 ab	17.8 a	5 ab	17.5 a	29 ab
		5	5 abc	62.5 ab	8.5 ab	14.5 ab	12.4 abc	20 ab
		7.5	7 ab	46.7 ab	13 ab	29.8 ab	0.8 bc	2 ab
	NaCl	2.5	0 c	0 c	0 b	0 b	0 c	0 b
		5	0 c	0 c	0 b	0 b	0 c	0 b
		7.5	0 c	0 c	0 b	0 b	0 c	0 b
3B14	kontrol		11.33 a	58.9 bc	2.4 ab	10.1 a	28.7 ab	51 b
	manitol	2.5	11.67 a	54.6 cd	4.9 a	5 a	35.5 ab	65 b
		5	8 ab	69.2 bcd	9.8 a	4.9 a	16.2 c	24 d
		7.5	0 b	0 e	0 ab	0 a	0 d	0 e
	sorbitol	2.5	7 ab	57.4 bcd	4.9 a	10.2 a	27.6 b	48 c
		5	9 ab	75.5 abc	6.4 a	8.3 a	10.3 c	14 d
		7.5	4 ab	100 a	0 ab	0 a	0 d	0 e
	PEG	2.5	11 a	67.1 bcd	8.2 a	7.7 a	16.9 c	26 d
		5	11 a	43.4 d	5.4 a	11.2 a	40 a	93 a
		7.5	2 b	83.3 ab	16.7 a	0 a	0 d	0 e
	NaCl	2.5	6 ab	66.8 bcd	6.8 a	13.5 a	12.9 c	19.4 d
		5	3 ab	75.1 ab	15.7 a	9.2 a	0 d	0 e
		7.5	0 b	0 e	0 ab	0 a	0 d	0 e

Ket.: Huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata pada jenis dan konsentrasi osmotikum berdasarkan uji lanjut BNJ(α 0,05)

Lampiran 5. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap penghambatan pembentukan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	73.02	59.45	42.13
Sorbitol	60.32	48.63	41.16
PEG	49.21	45.93	29.39
NaCl	100	100	73.52

Lampiran 6. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES pada 3 genotip kedelai yang diuji

Tabel 1. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase globuler pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	-12.51	68.86	29.94
Sorbitol	37.07	48.94	31.81
PEG	6.67	37.32	9.68
NaCl	100	100	19.69

Tabel 2. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase hati pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	-77.08	-30	-104.17
Sorbitol	-79.17	-9.17	-56.94
PEG	-220.83	-63.75	-320.83
NaCl	100	100	-212.50

Tabel 3. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase torpedo pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	58.91	43.51	67.33
Sorbitol	37.62	46.52	38.94
PEG	0.99	48.81	37.62
NaCl	100	100	25.08

Tabel 4. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan perkembangan ES fase kotiledon pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	57.84	23.54	39.96
Sorbitol	57.26	8.86	55.98
PEG	18.35	28.44	33.91
NaCl	100	100	85.02

Tabel 5. Pengaruh beberapa jenis osmotikum terhadap persentase penurunan maturasi ES pada 3 genotip kedelai yang diuji

Jenis Osmotikum	Petek	L.Bewok	3B14
Manitol	71.54	54.96	41.83
Sorbitol	71.87	31.53	59.48
PEG	42.66	54.05	22.22
NaCl	100	100	87.32

Lampiran 7. Nilai Potensial Osmotik pada jenis dan konsentrasi Osmotikum

Perlakuan(%)	Manitol(MPa)	Sorbitol(MPa)	PEG(MPa)	NaCl(MPa)
2.5	-0.340	-0.340	-0.010	-1.060
5	-0.680	-0.680	-0.020	-2.121
7.5	-1.021	-1.021	-0.031	-3.182

Perhitungan nilai potensial osmotikum diperoleh dari :

$$\pi = \frac{N.R.T}{V}$$

Diketahui:

$$N = \frac{\text{Kebutuhan Osmotikum}}{BM}$$

R = Konstanta gas = 0.00832 Liter MPa

T = suhu ruang (Kelvin) = $25^{\circ}\text{C} + 273 = 298^{\circ}\text{K}$

V = Volume (Liter)

Contoh Perhitungan :

Manitol 2,5% dalam 1 Liter media,

$$N = \frac{\text{Kebutuhan Osmotikum}}{BM} = \frac{25(\text{g/L})}{182.2} = 0.1372119$$

$T = 298^{\circ}\text{K}$

$R = 0.00832$ Liter MPa

$V = 1$ Liter

$$\pi = \frac{N.R.T}{V} = \frac{0.1372119 \cdot 0.00832 \cdot 298}{1} = 0.3401968$$

Jadi nilai potensial osmotik manitol 2,5% pada 1 Liter media adalah -0,340 MPa