

**PENGUJIAN *IN VITRO* BEBERAPA VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* L. Merr)
TOLERAN KEKERINGAN MENGGUNAKAN *Polyethylene Glikol* (PEG) 6000
PADA MEDIA PADAT DAN CAIR**

Evika Sandi Savitri

Staf Pengajar Jurusan Biologi, Fakultas Sains & Teknologi, UIN Maliki Malang

ABSTRAK

Kondisi stres kekeringan secara in vitro dapat disimulasi dengan menurunkan potensial air media, yaitu dengan penambahan PEG (polietilena glikol). Penapisan secara in vitro dilakukan dengan memanfaatkan komponen penyeleksi yang dapat mensimulasikan cekaman lingkungan. Pada penapisan in vitro, penambahan komponen seleksi harus dipilih, sehingga pada konsentrasi yang tepat dapat mengelompokkan varietas kedelai yang peka, moderat dan toleran. Salah satu respon tanaman terhadap cekaman kekeringan yaitu terjadi perkecambahan yang abnormal. Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui respon perkecambahan varietas kedelai yang ditanam pada media in vitro dengan penambahan PEG 6000 dan untuk mengetahui konsentrasi PEG yang mampu menyeleksi varietas kedelai peka dan toleran kekeringan pada media padat dan media cair.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yang pertama pengujian pada media padat, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf perlakuan (0 gr/l; 20 gr/l; 40 gr/l dan 60 r/l), dan faktor kedua adalah varietas kedelai (Wilis, Tanggamus, Grobogan, Argomulyo, Kaba dan Panderman). Penelitian ini menggunakan 24 kombinasi perlakuan dengan 3 ulangan. Penelitian kedua pengujian pada media cair, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor. Faktor pertama adalah varietas kedelai yang terdiri dari 3 taraf yaitu: Wilis, Tanggamus dan Grobogan. Faktor kedua adalah konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu: 0%, 5%, 10% dan 15%, yang masing-masing setara dengan potensial air 0; -0,13; -0,19; -0,41 MPa. Pada penelitian media padat, berdasarkan hasil indeks sensitivitas kekeringan, varietas Grobogan, Argomulyo dan Kaba menunjukkan respon peka kekeringan, sedangkan varietas Wilis dan Argomulyo menunjukkan respon toleran kekeringan dan varietas Tanggamus menunjukkan respon medium toleran. Konsentrasi PEG 60 gr/l mampu mensimulasi kekeringan pada media padat. Pada media cair, berdasarkan indeks sensitivitas menunjukkan varietas Tanggamus dan Wilis bersifat medium toleran dan Grobogan peka terhadap kekeringan. Konsentrasi PEG 5% pada media MS cair in vitro mampu mensimulasikan cekaman kekeringan.

Kata kunci : Pengujian in vitro, varietas kedelai, media padat, media cair

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan salah satu kebutuhan pokok bagi masyarakat misalnya sebagai bahan baku makanan atau sebagai bahan susu kedelai. Kebutuhan kedelai meningkat setiap tahunnya sehingga menimbulkan tantangan yang berat bagi pembangunan pertanian kedelai. Tantangan ini semakin berat karena di satu sisi laju permintaan terus meningkat, akan tetapi disisi lain muncul beberapa permasalahan diantaranya keterbatasan lahan yang sempit sehingga dilakukan ekstensifikasi pada lahan marjinal seperti lahan masam, lahan kering atau lahan yang kesuburannya rendah.

Penggunaan PEG sebagai agen penyeleksi ini telah banyak digunakan untuk penapisan kekeringan pada kedelai (Hamim, 1996 dan Widoretno, 2004), pada kacang tanah (Rahayu,

2004), pada kalus nilam (Sudjahjo, 2007) dan skrinng *in-vitro* pada tomat (Kulkarni, 2007). Dalam Kulkarni (2007), penggunaan 4 konsentrasi PEG antara 0, 20, 40 dan 60 gr/l ini, yang mampu menapis tanaman tomat terhadap kekeringan berkisar 60 gr/l. Menurut Sirait (2001), penapisan secara *in vitro* untuk sifat ketahanan terhadap cekaman abiotik mempunyai keunggulan komparatif, antara lain waktu seleksi lebih singkat, tidak membutuhkan ruang yang luas, mudah dikontrol dan tidak dibatasi oleh musim.

Menurut Kosmiatin (2005), kedelai yang ditanam dalam media dengan penambahan PEG dapat digunakan sebagai indikator kemampuan senyawa PEG untuk menstimulasikan cekaman kekeringan dalam media *in-vitro*. Pengujian pada media yang berbeda akan menunjukkan pengelompokan yang berbeda. Berdasarkan latar

belakang di atas maka perlu dilakukan pengujian terhadap beberapa varietas kedelai pada fase perkecambahan untuk mengelompokkan varietas yang toleran dan peka terhadap cekaman kekeringan menggunakan PEG 6000 pada media padat dan media cair.

Salah satu respon tanaman terhadap cekaman kekeringan yaitu terjadi perkecambahan yang abnormal. Empat genotipe kedelai yang di uji menunjukkan ada yang bersifat peka, moderat dan toleran. Penambahan PEG 10% ke dalam seluruh media pada eksplan embrio masak memperlihatkan persentase perkecambahan yang sesuai dengan tingkat toleransinya terhadap kekeringan. Pada kelompok peka, rata-rata perkecambahan hanya 25%, moderat 35% dan toleran 60%.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui respon perkecambahan varietas kedelai yang ditanam pada media *in vitro* dengan penambahan PEG 6000 dan untuk mengetahui konsentrasi PEG yang mampu menyeleksi varietas kedelai peka dan toleran kekeringan pada media padat dan media cair.

METODE PENELITIAN

Penelitian I

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf perlakuan (0 gr/l; 20 gr/l; 40 gr/l dan 60 r/l), dan faktor kedua adalah varietas kedelai (Wilis, Tanggamus, Grobogan, Argomulyo, Kaba dan Panderman). Penelitian ini menggunakan 24 kombinasi perlakuan dengan 3 ulangan. Dengan demikian dalam penelitian secara keseluruhan terdapat 72 kombinasi perlakuan per-unit percobaan.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: botol kultur, pinset, erlenmeyer, cawan petri, labu takar, gelas ukur, beaker glass, pipet, laminar Air flow, rak kultur, autoklaf, pH meter, bunsen spiritus, timbangan analitik, hot plate, penyemprot alkohol (*hand sprayer*), lemari pendingin, kamera, thermometer; kertas label, kertas tissue, korek, aluminium foil, plastik gulung, karet gelang dan plastik cling wrap. Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi kedelai (Wilis, Tanggamus, Grobogan, Argomulyo, Kaba dan Panderman), PEG (*polyethylena glikol*) 6000, bahan dasar MS (*Murashige dan Skoog*) (larutan stok makronutrien medium MS; larutan stok mikronutrien medium MS, larutan stok sumber besi, aquades steril, agar bacto, larutan stok organik yaitu sukrosa, vitamin, asam amino), alkohol 70%, spiritus, tepol, detergen, dan bayclin 20%. Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N.

PROSEDUR PENELITIAN

Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dan *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting) di cuci dengan detergen, kemudian direndam selama $\pm 1 \times 24$ jam dalam larutan tyopol. Setelah terendam selama 1 hari, alat-alat tersebut dicuci dengan air mengalir kemudian di autoclave. Alat dari bahan gelas di tutup plastic, sedangkan alat-alat dari bahan logam dan cawan petri dibungkus dengan kertas payung. Kemudian semua alat tersebut di setrilisasi dalam autoklaf pada temperature 121 °C, 17,5 psi selama 60 menit.

Pembuatan media

Media MS (*Murashige-Skoog*) dibuat larutan stok terlebih dahulu. Medium tersebut ditambahkan agar 13,5 g (tidak dibuat stok). Selanjutnya medium dipanaskan sampai mendidih dan diaduk. Setelah media telah homogen dan mendidih.

Bahan PEG ditimbang sesuai takaran; 0, 20, 40 dan 60 gr/l. media tersebut dituangkan ke dalam beaker glass yang berisi PEG (sesuai konsentrasi yang dibutuhkan), kemudian di homogenkan dan di masukkan kedalam botol kultur sebanyak 20 ml. Setiap botol ditutup dengan plastik gulung. Setelah media yang digunakan telah siap, maka media tersebut disterilkan dengan di autoklaf pada suhu 12 °C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan biji dilakukan 2 tahap, yaitu sterilisasi tahap luar dan tahap dalam LAF. Sterilisasi tahap luar yaitu biji diambil, kemudian dicuci dengan detergen selama 10 menit, untuk pembilasan dilakukan sampai busa detergen hilang dan pembilasan terakhir dilakukan dengan dicuci air mengalir. Biji direndam klorok/bayclin 20% selama 20 menit

Perhitungan Indeks Sensitivitas

Perhitungan indeks sensitivitas kekeringan (S), untuk masing-masing peubah dapat digunakan rumus dari Fischer dan Maurer (1978), yaitu :

$$S = \frac{1-Y/Y_p}{1-X/X_p}$$

Keterangan :

Y = Nilai rata-rata pengamatan untuk satu varietas tertentu pada kondisi stress PEG; Y_p = Nilai rata-rata pengamatan untuk satu varietas tertentu pada kondisi non stress PEG (kontrol); X = Nilai rata-rata pengamatan untuk seluruh varietas tertentu pada kondisi stress PEG; X_p = Nilai rata-rata pengamatan untuk seluruh varietas tertentu pada kondisi non stress PEG (kontrol)

Rumus di atas memiliki kriteria terhadap kekeringan seperti berikut dari satu varietas kecil sebagai toleran terhadap stress kekeringan apabila

mempunyai nilai $S < 0,5$ dan medium jika $0,5 < S < 1$ dan peka jika $S > 1$

Penelitian II

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktor. Faktor pertama adalah varietas kedelai yang terdiri dari 3 taraf yaitu: Wilis, Tanggamus dan Grobogan. Faktor kedua adalah konsentrasi PEG 6000 yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu: 0%, 5%, 10% dan 15% (Lampiran 1), yang masing-masing setara dengan potensial air 0; -0,13; -0,19; -0,41. Pada penelitian Suwarsi (2005), konsentrasi PEG 10% dan 15% mempunyai dampak kerusakan tunas kacang tanah, adapun penelitian Kosmiatin (2005), PEG dengan konsentari 15% dan 10% mampu merespon pertumbuhan eksplan polong kedelai. Penelitian ini menggunakan 12 kombinasi perlakuan dengan 4 ulangan. Dengan demikian dalam penelitian secara keseluruhan terdapat 48 kombinasi perlakuan per-unit percobaan

**Prosedur Penelitian
Pembuatan media**

Media MS (Murashige-Skoog) dilakukan dengan pembuatan larutan stok terlebih dahulu. Pembuatan medium padat menggunakan agar dan media cair tidak menggunakan agar. Medium dipanaskan sampai mendidih dan diaduk, kemudian diangkat. Media padat tidak ditambah dengan PEG. Media cair ditambahkan PEG sesuai dengan

perlakuan konsentaras. Kemudian medium diisikan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml. Pada media cair diletakkan busa yang telah dilubangi (Suwarsi, 2005). Media masing- masing ditutup dengan plastik tahan panas dan diikat dengan karet kemudian media disterilkan.

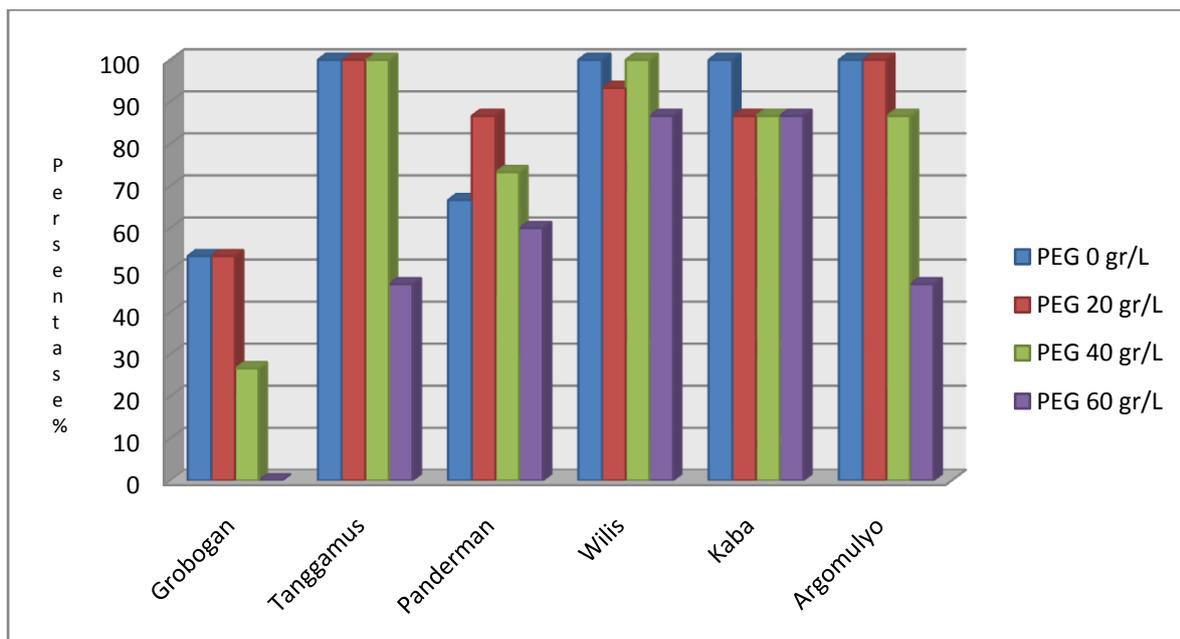
Penanaman Eksplan Epikotil

Epikotil diambil dari benih yang telah dikedambahkan pada media padat tanpa PEG. Epikotil di potong sepanjang 2 cm. Epikotil ditanam pada media cair mengandung PEG yang sudah disiapkan. Epikotil kedelai ditanam pada tiga buah lubang dengan diameter 2 mm pada bagian busa . Epikotil diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25 C dan kelembaban ruang 70% selama 1 bulan (Suwarsi, 2005).

**HASIL DAN PEMBAHASAN
PENELITIAN I**

Persentase Perkecambahan Beberapa Varietas Kedelai Pada 14 dan 28 HST

Berdasarkan hasil pengamatan pada 14 HST, diketahui bahwa ada pengaruh antara varietas dan pemberian PEG pada parameter persentase perkecambahan. Adapun data rata-rata perkecambahan kedelai dari beberapa varietas selama 14 HST dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh pemberian PEG terhadap persentase perkecambahan (%) pada beberapa varietas kedelai selama 14 HST

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan selama 14 hari, persentase

perkecambahan varietas Wilis, Panderman dan Kaba berlangsung baik, bahkan pada konsentrasi

60gr/l masih mampu berkecambah dengan menunjukkan persentase perkecambahan yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase perkecambahan varietas Grobogan, tanggamus dan Argomulyo (gambar 1). Perlakuan dengan penambahan PEG pada media telah mampu menurunkan kemampuan perkecambahan pada semua varietas yang digunakan. Konsentrasi 60 gr/l PEG ini mampu menyeleksi varietas pada pengamatan persentase perkecambahan, sehingga dapat diketahui bahwa pada media dengan penambahan PEG 60gr/l ini dapat digunakan sebagai acuan rekomendasi untuk digunakan sebagai simulasi cekaman kekeringan buatan pada media tumbuh.

Indeks Sensivitas Kekeringan Beberapa Varietas Kedelai Pada Media MS Padat menggunakan PEG (Polietilena glikol) 6000

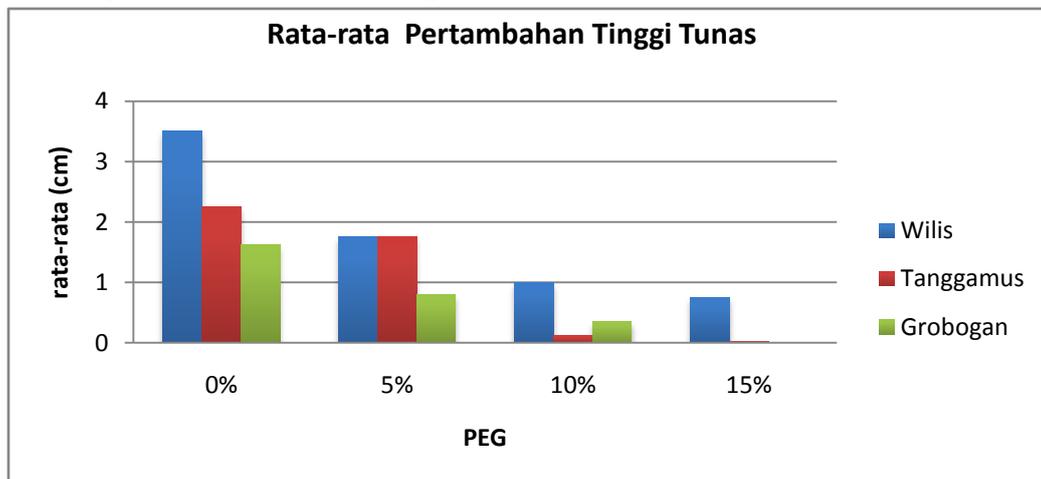
Hasil perkecambahan pada penelitian ini juga dapat dihitung indeks sensitivitas kekeringan dengan tujuan untuk mengelompokkan varietas kedelai ke dalam kelompok toleran, medium dan peka kekeringan. Pada umur kecambah 14 HST varietas Panderman dapat dikelompokkan ke dalam sifat toleran kekeringan dengan nilai indeks sensitivitas kekeringan $S < 0.5$ dan varietas Grobogan,

Tanggamus, Kaba dan Argomulyo dikelompokkan ke dalam kelompok peka kekeringan dengan nilai $S > 1$ sedangkan nilai S untuk Wilis yaitu $0.5 < S < 1$ yang berarti bahwa varietas ini termasuk ke dalam kelompok medium toleran. Sedangkan pada umur kecambah 28 HST nilai indeks sensitivitas seluruh varietas kedelai tidak berbeda dengan nilai indeks umur kecambah 14 HST, kecuali untuk nilai indeks sensitivitas pada varietas Tanggamus. Varietas Tanggamus ini memiliki nilai indeks sensitivitas $0.5 < S < 1$ yang berarti varietas ini dapat dikelompokkan dalam medium toleran.

PENELITIAN II

Pengaruh Polietilena glikol (PEG) 6000 Pada Media MS Cair Terhadap Pertambahan Tinggi Tunas Beberapa Eksplan Epikotil Varietas Kedelai

Hasil penelitian menunjukkan respon epikotil beberapa varietas kedelai terhadap cekaman kekeringan dengan media PEG 6000 pada konsentrasi (5%, 10%, 15%) terhadap parameter pertambahan tinggi tunas, menunjukkan rata-rata pertambahan tinggi tunas (cm) yang berbeda.



Gambar 2; Indeks Sensivitas Kekeringan Eksplan Epikotil Beberapa Varietas Kedelai Pada Media MS Cair Polietilena glikol (PEG) 6000

Hasil dari perhitungan indeks sensitivitas tingkat toleransi tanaman kedelai terhadap cekaman kekeringan dapat dilakukan berdasarkan indeks sensitivitas kekeringan pada peubah prosentase pertumbuhan eksplan.

$$S_{wilis} = \frac{1 - \frac{y}{yp}}{1 - \frac{x}{xp}} = \frac{1 - \frac{72,21}{91,67}}{1 - \frac{52,77}{88,55}} = \frac{1 - 0,79}{1 - 0,593} = \frac{0,21}{0,407} = 0,52 = \text{Medium}$$

$$S_{Tanggamus} = \frac{1 - \frac{y}{yp}}{1 - \frac{x}{xp}} = \frac{1 - \frac{61,1}{91,67}}{1 - \frac{52,77}{88,55}} = \frac{1 - 0,67}{1 - 0,593} = \frac{0,33}{0,407} = 0,81 = \text{Medium}$$

$$S_{grobogan} = \frac{1 - \frac{y}{yp}}{1 - \frac{x}{xp}} = \frac{1 - \frac{25}{83,3}}{1 - \frac{52,77}{88,55}} = \frac{1 - 0,30}{1 - 0,593} = \frac{0,7}{0,407} = 1,7 = \text{Peka}$$

Berdasarkan indeks sensitivitas terhadap cekaman menggunakan persentase pertumbuhan eksplan per tanaman disimpulkan bahwa kedelai varietas Grobogan tergolong peka terhadap cekaman kekeringan. Hasil indeks sensitivitas Grobogan sejalan dengan perhitungan parameter tinggi tunas, jumlah daun normal, jumlah daun layu dan persentase pertumbuhan epikotil yang menunjukkan varietas tersebut peka terhadap kekeringan. Pada varietas Wilis dan Tanggamus berdasarkan hasil indeks sensitivitas terhadap cekaman menggunakan persentase pertumbuhan eksplan per tanaman disimpulkan medium. Peningkatan tinggi tunas dan jumlah daun normal dalam kondisi lingkungan cekaman kekeringan dapat digunakan sebagai indikator toleransi cekaman kekeringan pada kedelai.

Dalam deskripsi varietas Tanggamus merupakan varietas yang toleran terhadap kekeringan begitu juga sejalan dengan penelitian (Azizah, 2010), pertumbuhan kalus pada media PEG pada perhitungan indeks sensitivitas pada peubah berat kalus menyatakan Tanggamus merupakan varietas yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Pengujian kalus sama dengan pengujian genotip yang dimiliki pada varietas tersebut tetapi pada penelitian ini yang dilakukan dengan pengujian epikotil benih pada perhitungan indeks sensitivitas, varietas Tanggamus masuk kategori masuk kategori medium kemungkinan disebabkan kondisi vaibilitas benih awal yang kurang optimal, pada penelitian Azizah (2010), uji in vitro dengan media padat pada perhitungan indeks sensitivitas pada peubah persentase perkecambahan 28HST, Tanggamus masuk dalam kategori medium. Hasil penelitian (Hanum, 2007) Wilis merupakan varietas yang adaptif terhadap toleran cekaman kekeringan, yang ditunjukkan bahwa kemampuan genotip pada perlakuan cekaman kekeringan hasil menunjukkan penurunan bobot kering akar paling rendah.

KESIMPULAN

1. Pada media padat, berdasarkan hasil indeks sensitivitas kekeringan, varietas Grobogan, Argomulyo dan Kaba yang ditanam pada media dengan penambahan PEG 6000 menunjukkan respon peka kekeringan, sedangkan Varietas Wilis dan Argomulyo menunjukkan respon toleran kekeringan dan Varietas Tanggamus menunjukkan respon medium toleran. Pada media cair, berdasarkan indeks sensitivitas menunjukkan varietas Tanggamus dan Wilis Medium dan Grobogan Peka.
2. Konsentrasi PEG yang mampu mensimulasi kekeringan pada media padat yaitu yaitu konsentrasi 60 gr/l. Konsentrasi PEG 5% pada media MS cair *in vitro* mampu

mensimulasikan cekaman kekeringan pada parameter tinggi tunas, jumlah daun normal, jumlah daun layu, persentase pertumbuhan, skor kerusakan eksplan dan indeks sensitivitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Hanum, C. dkk. 2007. Pertumbuhan Akar Kedelai pada Cekaman Alumunium, Kekeringan dan Cekaman Ganda Alumunium dan Kekeringan. *Agritop* (26) 1: 13-18
- Kosmiatin, M, S. Hutami, A. Husni, dan I. Mariska. 2005. Penapisan Cepat Toleransi Kedelai Terhadap Kekeringan secara In Vitro. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*: Vol. 24 No.3.
- Michel, B.E and M.R Kaufman. 1973. *The Osmotic Potential of PEG 6000*. Plant Physiol.
- Rahayu. 2004. Stres oleh PEG dalam Media In Vitro dan Penapisan toleransi Kacang Tanah terhadap Kekeringan. *Prosiding Simposium PERIPI*: 5-7 Agustus.
- Rahayu. 2005. Polietilena Glikol (PEG) dalam Media In Vitro Menyebabkan Kondisi Cekaman yang Menghambat Tunas Kacang Tanah. *Penelitian Hayati*: 11 (39-48).
- Sirait, B. 2001. *Evaluasi karakter morfofisiologis dan produksi galur kedelai (Glycine max (L) Merr) toleran aluminium yang diseleksi secara in vitro*. Tesis. Program Pascasarjana IPB.
- Widoretno, dkk. 2002. Efektivitas Polyethelena Glycol untuk Mengevaluasi Tanggapan Genotip Kedelai terhadap Cekaman Kekeringan pada Fase Perkecambahan. *Hayati* 9: 33-36.
- Widoretno, W. Sudarsono. 2004. Evaluasi Sejumlah Galur kedelai Varian Somaklonal Hasil Seleksi In Vitro terhadap Stres Kekeringan. *Hayati*, 11: 11-20.