I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan komoditas pangan sebagai sumber utama protein nabati dan minyak nabati yang sangat penting karena gizinya dan aman dikonsumsi. Pemanfaatan utama kedelai adalah dari biji. Di Indonesia, biji kedelai umumnya dikonsumsi dalam bentuk pangan olahan seperti: tahu, tempe, kecap, tauco, susu kedelai, dan berbagai makanan ringan (Damardjati *et al*., 2005).

Kebutuhan akan kedelai terus meningkat setiap tahunnya. Rata-rata kebutuhan kedelai ± 2,3 juta ton/tahun. Berdasarkan data tahun 2011, produksi dalam negeri sebesar ± 851,29 ribu ton biji kering atau hanya mencukupi ± 37,01% dari kebutuhan, sisanya ± 64% diimpor dari negara lain (BPS, 2012). Besarnya impor tersebut menyebabkan kehilangan devisa negara yang cukup besar dan sangat rentan terhadap ketahanan pangan nasional (Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, 2012). Oleh karena itu, perlu upaya intensifikasi dan ekstensifikasi untuk meningkatkan produksi kedelai dalam negeri.

Kebijakan Kementerian Pertanian dicerminkan pada visinya untuk mewujudkan pertanian industrial unggul berkelanjutan yang berbasis sumberdaya lokal untuk

meningkatkan kemandirian pangan, nilai tambah, daya saing, ekspor dan kesejahteraan petani. Untuk mencapai visi tersebut dibutuhkan seperangkat teknologi yang tepat untuk mengangkat posisi sumber daya genetik lokal, terutama yang mendorong kemandirian nasional dan kesejahteraan petani (Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, 2013).

Salah satu upaya yang perlu dilakukan adalah menemukan varietas unggul. Salah satunya dapat diperoleh melalui rekayasa genetika (transformasi genetik). Keberhasilan transformasi genetik untuk memperoleh tanaman transgenik sangat ditentukan oleh teknik regenerasi *in vitro* (Pardal, 2001). Regenerasi *in vitro* atau kultur jaringan berfungsi untuk meregenerasikan tanaman transgenik dari sel atau jaringan transgenik (Utomo, 2010).

Beberapa faktor biotik dan abiotik serta hama dan penyakit dapat menurunkan kualitas dan produksi tanaman. Tantangan biotik dan abiotik dapat diatasi dengan rencana perbaikan tanaman secara sistematis dalam rangka meningkatkan produksi tanaman yang melibatkan penggunaan teknologi baru dan pengembangan kultivar baru dengan kualitas yang diinginkan (Joyner *et al.*, 2010).

Utomo (2012) menjelaskan bahwa varietas merupakan sekelompok tanaman dalam satu spesies yang secara genetik memiliki kriteria DUS yaitu *distinct* (berbeda), *uniform* (seragam), dan *stable* (stabil). Varietas budidaya (kultivar) yang memiliki sifat unggul bernilai ekonomi disebut varietas unggul. Jenis varietas unggul terdiri dari varietas galur murni (inbrida), hibrida, komposit,

sintetik, multi galur, dan klon. Berbagai jenis varietas tersebut dapat dirakit menggunakan teknik pemuliaan tradisional maupun modern/bioteknologi.

Keberhasilan penerapan bioteknologi dalam perbaikan tanaman didasarkan pada protokol regenerasi *in vitro* tanaman yang efisien. Regenerasi *in vitro* yang efisien diperlukan untuk meregenerasikan tanaman transgenik dari sel atau jaringan transgenik. Tanggapan eksplan dalam kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh tiga faktor utama yaitu fisiologi tanaman, manipulasi *in vitro*, dan stres fisiologi *in vitro* (Lazzeri *et al.*, 1985).

Regenerasi *in vitro* kedelai melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui dua proses yang berbeda, yaitu melalui organogenesis (*shoot morphogenesis*) dan embriogenesis somatik (*somatic embryogenesis*). Organogenesis dan embriogenesis somatik sangat tergantung kepada sumber eksplan dan jenis media kultur yang digunakan. Kedua proses tersebut sangat dipengaruhi oleh kultivar/genotipe tanaman (*cultivar-specific responses*), di mana beberapa galur lebih responsif terhadap media kultur dari galur lainnya (Barwale *et al*., 1986).

Beberapa penelitian tentang regenerasi *in vitro* kedelai melalui jalur embriogenesis somatik telah dilakukan dengan eksplan kotiledon muda (Lippmann dan Lippmann,1984; Pardal *et al.*, 1997; Hiraga *et al.*, 2007; Loganthan *et al.*, 2010), hipokotil (Gamborg *et al.*, 1983; Phillips dan Collins, 1981), dan biji masak (Widoretno *et al.*, 2002). Regenerasi *in vitro* kedelai melalui organogenesis telah dilakukan dengan eksplan buku kotiledon (*cotyledonary nodes*) (Zhang *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000; Utomo, 2005; Marveldani *et al.*, 2007), daun muda (Wright *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1990), poros

embrio (McCabe *et al.*, 1988), potongan hipokotil (Dan dan Reichert, 1998; Reichert *et al.*, 2003; Wang dan Xu, 2008), dan belahan benih masak yang diimbibisi (Paz *et al.*, 2006; Joyner *et al.*, 2010).

Protokol regenerasi *in vitro* kedelai digunakan dalam transformasi genetik sehingga diharapkan memperbesar efisiensi transformasi genetik kedelai. Utomo *et al.* (2010) melaporkan prosedur regenerasi *in vitro* dari eksplan buku kotiledon enam varietas kedelai (Wilis, Sinabung, Anjasmoro, Kaba, Seluwah, dan Sibayak) melalui organogenesis. Eksplan buku kotiledon diperoleh dari benih yang dikecambahkan selama 5-6 hari. Proporsi eksplan yang menghasilkan tunas berkisar 43-100%. Rata-rata jumlah tunas per ekplan berkisar antara 7-36 tunas per eksplan.

Prosedur transformasi genetik kedelai dimodifikasi oleh Paz *et al.* (2006) dengan menggunakan eksplan buku kotiledon (*cotyledonary nodes*) dari benih masak. Benih masak diperoleh melalui perlakuan pra-kultur berupa pengecambahan 6 hari dan benih masak lainnya diperoleh dengan perlakuan imbibisi semalam. Prosedur ini juga yang dilakukan oleh Safitri (2013) yang menerapkan lima varietas kedelai pada masing-masing perlakuan pra-kultur (imbibisi dan pengecambahan). Rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan dengan perlakuan imbibisi yaitu 15,4 tunas per eksplan lebih tinggi daripada perlakuan pengecambahan 6 hari yaitu 12,9 tunas per eksplan.

Prosedur regenerasi *in vitro* kedelai dengan perlakuan pra-kultur imbibisi belum banyak digunakan. Namun, perlakuan imbibisi memiliki kelebihan dalam efisiensi waktu karena membutuhkan waktu yang lebih singkat dibandingkan

perlakuan pengecambahan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi efisiensi regenerasi *in vitro* empat varietas kedelai melalui perlakuan pra-kultur (imbibisi dan pengecambahan) dengan varietas yang berbeda.

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut

1. Bagaimana pengaruh perlakuan pra-kultur (imbibisi atau pengecambahan) terhadap efisiensi pembentukan tunas adventif kedelai?
2. Bagaimana perbedaan efisiensi pembentukan tunas adventif empat varietas kedelai?
3. Apakah terdapat interaksi antara perlakuan (imbibisi atau pengecambahan) dengan varietas kedelai?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah, penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh perlakuan pra-kultur (imbibisi atau pengecambahan) terhadap efisiensi pembentukan tunas adventif kedelai.
2. Membedakan efisiensi pembentukan tunas adventif dari empat varietas kedelai.
3. Mengetahui interaksi antara perlakuan (imbibisi atau pengecambahan) dengan varietas kedelai.

1.4 Landasan Teori

Dalam rangka menyusun penjelasan teoritis terhadap pertanyaan yang telah dikemukakan, maka disusun landasan teori sebagai berikut:

Pada tahapan kegiatan transformasi genetik kedelai, teknik kultur jaringan diperlukan dalam meregenerasikan sel atau jaringan transgenik. Tanpa sistem regenerasi tanaman yang efisien, akan sulit diperoleh tanaman transgenik yang diinginkan. Inilah yang merupakan salah satu alasan penggunaan teknik kutur jaringan dalam perbanyakan tanaman kedelai. Dua faktor yang mempengaruhi keberhasilan regenerasi yaitu faktor internal sel/jaringan eksplan dan faktor lingkungan. Faktor internal meliputi genotipe (varietas) tanaman, asal jaringan, tingkat perkembangan dan diferensiasi sel. Faktor lingkungan meliputi komposisi media, suhu, dan cahaya (Marveldani *et al.*, 2007)

Regenerasi tanaman secara *in vitro* dibagi menjadi dua proses yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik. Organogenesis adalah adalah proses terbentuknya organ seperti tunas atau akar, baik secara langsung dari permukaan eksplan atau secara tidak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu. Regenerasi *in vitro* kedelai melalui jalur organogenesis dapat menggunakan eksplan buku kotiledon (Cheng *et al*., 1980; Wright *et al*., 1986; Utomo, 2005; Marveldani *et al*., 2007), daun muda (Wright *et al*., 1987; Kim *et al*., 1990), poros embrio (McCabe *et al*., 1988), hipokotil (Dan dan Reivhert, 1998), serta belahan benih masak yang diimbibisi (Paz *et al*., 2006; Joyner *et al*., 2010).

Menurut Wattimena (1992), keberhasilan organogenesis tanaman secara *in vitro* dipengaruhi oleh empat golongan utama yaitu media yang digunakan mencakup komponen penyusun media dan ZPT, lingkungan tumbuh, fisiologi jaringan tanaman sebagai eksplan, dan genotipe atau varietas dari sumber bahan tanaman yang digunakan. Pemberian sitokinin eksogen diperlukan untuk mendorong tunas/akar untuk membentuk planlet karena kemungkinan sitokinin endogen tidak mencukupi untuk pembentukan planlet. Interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh endogen dengan zat pengatur tumbuh eksogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur (Azriati *et al.*, 2006).

Pada regenerasi kedelai melalui organogenesis, tidak semua varietas memberikan respon yang baik. Pierik (1987) dalam Pardal (2002) menyatakan bahwa masing-masing jenis eksplan dan genotipe memiliki respon pertumbuhan *in vitro* yang berbeda-beda walaupun ditumbuhkan pada media dan kondisi lingkungan tumbuh yang sama.

Tanaman transgenik yang dihasilkan dari rekayasa genetika umumnya berupa tunas adventif. Untuk meningkatkan efisiensi transformasi kedelai menggunakan *Agrobacterium*, eksplan buku kotiledon dilukai pada buku tempat tumbuh tunas aksilar. Tujuan dari pelukaan tersebut ialah untuk mencegah munculnya tunas aksilar, merangsang inisiasi tunas adventif majemuk dari meristem aksilar, dan meningkatkan efisiensi tunas (Utomo, 2005).

Cheng *et al*. (1980) melaporkan bahwa tunas majemuk dari meristem aksilar terbentuk pada buku kotiledon yang dikulturkan pada medium yang mengandung benzyl amino purine (BAP) > 2 µM. Buku kotiledon adalah satu kotiledon

beserta sebagian hipokotil sepanjang 3-5 mm. Penambahan BAP dalam media tersebut diduga dapat mengatasi dominasi apikal. Subkultur tunas majemuk dalam medium yang mengandung BAP menyebabkan pemanjangan tunas. Prosedur ini dimodifikasi oleh Wright *et al.* (1986) dan melaporkan pembentukan tunas efisien pada medium yang mengandung garam rendah dengan 5 µM BAP.

Marveldani *et al.* (2007) melaporkan bahwa konsentrasi BA yang terbaik untuk regenerasi eksplan buku kotiledon tiga varietas kedelai adalah 0,75 mg/l. Eksplan dikulturkan pada media MS yang ditambahkan BA sesuai perlakuan percobaan. Persentase eksplan membentuk tunas tertinggi ditunjukkan oleh varietas Ijen sebesar 77,5% dan rata-rata jumlah tunas per eksplan tertinggi ditunjukkan oleh varietas Sinabung yaitu sebanyak 5 tunas per eksplan.

Untuk memperoleh prosedur transformasi genetik kedelai varietas unggul nasional yang efisien, maka diperlukan prosedur regenerasi *in vitro* kedelai melalui organogenesis yang efisien. Paz *et al.* (2006) dalam penelitiannya mengembangkan prosedur transformasi kedelai menggunakan eksplan belahan buku kotiledon empat kultivar kedelai sebagai jaringan target dan menunjukkan keberhasilan dalam regenerasi untuk memproduksi tanaman transgenik. Sebelum dikulturkan dalam media tumbuh, eksplan belahan embrio masak berasal dari benih yang diimbibisikan selama semalam, sedangkan eksplan buku kotiledon berasal dari benih yang telah dikecambahkan selama 6 hari. Eksplan hasil imbibisi benih semalam menunjukkan efisiensi regenerasi 1,5 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kecambah 5-7 hari.

Safitri (2013) melaporkan juga bahwa efisiensi regenerasi *in vito* kedelai yang lebih tinggi diperoleh pada perlakuan pra-kultur imbibisi. Prosedur regenerasi yang digunakan hampir sama dengan Paz *et al.*(2006) menggunakan perlakuan pra-kultur (imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari). Lima varietas kedelai yang dievaluasi menggunakan eksplan buku kotiledon mendapatkan perlakuan pra-kultur sebelum dikulturkan pada media tumbuh. Rata-rata jumlah tunas adventif (RJTA) perlakuan pra-kultur imbibisi yaitu 15,4 tunas per eksplan lebih tinggi daripada perlakuan pengecambahan yaitu 12,9 tunas per eksplan.

Pengecambahan adalah proses pertumbuhan embrio dan komponen-komponen biji yang memiliki kemampuan untuk tumbuh secara normal menjadi tumbuhan baru. Komponen biji tersebut adalah bagian kecambah yang terdapat di dalam biji, misalnya radikula dan plumula (Sudjadi, 2006). Pengecambahan biji merupakan suatu proses dimana radikula (akar embrionik) memanjang ke luar menembus kulit biji. Di balik gejala morfologi dengan pemunculan radikula tersebut, terjadi proses fisiologi-biokemis yang kompleks, dikenal sebagai proses perkecambahan fisiologis (Salisbury dan Ross, 1995).

Menurut Sari (2012), perkecambahan diawali dengan proses imbibisi, yaitu penyerapan air dari lingkungan benih, dalam hal ini media perkecambahan. Perubahan yang terjadi adalah pembesaran benih dikarenakan sel-sel embrio mulai membesar dan radikula telah muncul. Perubahan hormon endogen selama perkecambahan diduga berperan dalam induksi sel-sel yang mampu membentuk embrio somatik.

Imbibisi merupakan proses masuknya air ke dalam benih sehingga mengaktifkan enzim-enzim untuk melakukan proses metabolisme. Air yang masuk ke dalam kotiledon menyebabkan volumenya bertambah, akibatnya kotiledon membengkak. Pembengkakan tersebut pada akhirnya menyebabkan pecahnya testa (Sudjadi, 2006).

1.5 Kerangka Pemikiran

Berdasarkan landasan teori yang telah dikemukakan, maka dapat disusun kerangka pemikiran berikut ini untuk memberikan penjelasan teoritis terhadap perumusan masalah.

Kedelai merupakan salah satu komoditas pertanian yang penting di Indonesia, karena mengandung protein nabati. Permintaan kedelai terus meningkat seiring dengan semakin beragamnya produk olahan yang berbahan dasar kedelai. Namun demikian, produksi kedelai nasional menurun tiap tahunnya. Oleh karena itu, penggunaan varietas unggul merupakan salah satu cara yang dapat mengatasi kendala tersebut. Varietas unggul baru yang memiliki keunggulan-keunggulan tertentu seperti varietas yang resisten terhadap serangan hama penyakit dapat dirakit salah satunya melalui pemuliaan non-konvensional yakni menggunakan rekayasa genetika. Kultur jaringan merupakan teknologi terapan yang mendukung program pemuliaan melalui rekayasa genetika. Eksplan transgenik yang jaringannya telah mengandung gen asing dari hasil rekayasa genetika dapat diregenerasikan melalui kultur jaringan.

Regenerasi *in vitro* kedelai dapat dilakukan melalui proses embriogenesis somatik maupun organogenesis. Regenerasi *in vitro* yang dilakukan dalam penelitian ini

adalah melalui jalur organogenesis. Organ baru yang diharapkan ialah tunas-tunas adventif yang berasal dari buku kotiledon empat varietas kedelai sebagai eksplan. Setiap varietas diberikan perlakuan pra-kultur (imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari).

Keberhasilan regenerasi tunas menggunakan buku kotiledon ini juga dipengaruhi oleh metode pra-kultur yang digunakan. Metode pra-kultur yang selama ini digunakan pada beberapa penelitian adalah metode pengecambahan 5-7 hari. Namun, perlakuan pra-kultur imbibisi memiliki kelebihan dalam hal efisiensi waktu. Dari beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan juga menunjukkan hasil regenerasi yang lebih efisien pada perlakuan pra-kultur imbibisi daripada pengecambahan 6 hari.

Imbibisi merupakan proses peresapan air ke dalam ruangan antardinding sel, sehingga dinding selnya akan mengembang. Pada peristiwa perendaman terjadi proses imbibisi oleh kulit biji tanaman. Efek yang terjadi adalah membesarnya ukuran biji karena sel embrio membesar dan biji melunak. Salah satu syarat imbibisi adalah perbedaan tekanan antara benih dan larutan, dimana tekanan benih lebih kecil daripada tekanan larutan.

Pengecambahan adalah proses pengaktifan kembali aktivitas pertumbuhan *embryonic axis* di dalam benih yang terhenti untuk membentuk bibit. Proses pengecambahan dibedakan menjadi 2 proses yaitu proses morfologis dan fisiologis. Proses pengecambahan morfologis meliputi pertumbuhan *embryonic axis* sebagai akibat proses pembentukan sel-sel baru pada embrio yang akan diikuti proses diferensiasi sel-sel, sehingga terbentuk plumula (bakal batang dan

daun) dan radikula (bakal akar). Proses pengecambahan fisiologis adalah perubahan kondisi embrio di dalam benih yang semula berada pada kondisi dorman kemudian mengalami sejumlah perubahan fisiologis yang menyebabkan ia berkembang menjadi kecambah. Perubahan fisiologis ini melalui 3 tahap yakni imbibisi (penyerapan air oleh benih), pengaktifan enzim untuk proses metabolisme, dan perkecambahan.

Kandungan hormon endogen dalam setiap tanaman (genotipe) berbeda sehingga respons tanaman tidak sama. Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari hormon yang berada dalam eksplan (endogen) dengan hormon eksogen yang diserap dari media tumbuh. Pada proses imbibisi dan pengecambahan, terjadi pengaktifkan kinerja enzim di dalam benih untuk proses pertumbuhan sehingga proses-proses fisiologi dalam benih menjadi aktif.

Penambahan ZPT dari golongan sitokinin juga diperlukan dalam regenerasi *in vitro* kedelai secara organogenesis untuk mencegah dominasi tunas apikal serta merangsang tumbuhnya mata tunas samping. ZPT yang telah banyak digunakan dalam regenerasi *in vitro* kedelai secara organogenesis adalah *benzyl adenine* (BA) karena mempunyai efektivitas yang tinggi dalam perbanyakan tunas dan harganya relatif murah.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui prosedur yang tepat dan efisien dalam regenerasi tunas kedelai dengan melihat kemampuan masing-masing varietas dalam membentuk tunas adventif, apakah setelah dilakukan imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari dapat meningkatkan efisiensi

munculnya tunas adventif pada eksplan buku kotiledon kedelai sehingga diharapkan dapat memperbaiki prosedur organogenesis dalam mendukung program pemuliaan kedelai melalui rekayasa genetika.

1.6 Hipotesis

Dari kerangka pemikiran yang dikemukakan disusun hipotesis sebagai berikut:

1. Efisiensi regenerasi *in vitro* secara organogenesis melalui perlakuan pra-kultur imbibisi 20 jam lebih tinggi daripada perlakuan pra-kultur pengecambahan 6 hari.
2. Terdapat perbedaan efisiensi regenerasi *in vitro* secara organogenesis dari empat varietas kedelai menggunakan eksplan buku kotiledon.
3. Terdapat interaksi antara perlakuan pra-kultur melalui imbibisi 20 jam atau pengecambahan 6 hari dengan varietas kedelai.