

**PENGARUH PERIODE IMBIBISI TERHADAP INDUKSI EMBRIO
SOMATIK DUA VARIETAS KACANG TANAH
(*Arachis hypogea* L.) SECARA *IN VITRO***

Akari Edy¹, Resmia Fajarwati Hendrady², dan Setyo Dwi Utomo¹

¹Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung,

Jl. Prof. Soemantri Brodjonegoro, No.1, Bandar Lampung 35145

E-mail: akariedy@yahoo.com

²Alumnus Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung

ABSTRACT

EFFECT OF IMBIBITIONS PERIOD ON INDUCING SOMATIC EMBRYO OF TWO VARIETIES OF PEANUT (*Arachis hypogea* L.) IN VITRO CULTURE. *The objectives of the experiment were to (1) investigate the effect of seed imbibitions period on inducing somatic embryo of peanut varieties, (2) determine the best imbibitions period. The experiment was arranged in a completely randomized design with eight replicates. Each experimental unit consisted of culture bottles each of which contained five leaflet explants. Two varieties of peanut of var. Kancil and var. Singa were imbibed in water for 0, 20, 40, and 60 hours before sown aseptically on MS medium. Data were subjected to analysis of variance and if there was any significant F result (s), the means were separated using least significant difference at $P \leq 0.05$. Results of the experiment showed that: (1) Imbibitions period had significant effect on inducing somatic embryo of peanut varieties, (2) For var. Kancil, the best embryo somatic numbers and embryonic callus percentage were produced by 40 hours of imbibitions, while for var. Singa were produced by 20 hours imbibitions.*

Key words: *peanut, imbibitions period, MS medium, somatic embryo*

PENDAHULUAN

Varietas unggul dapat dirakit melalui metode konvensional maupun non-konvensional. Salah satu metode rekayasa genetika yang digunakan dalam melakukan perakitan varietas unggul adalah kultur jaringan. Rekayasa genetika menggunakan metode kultur jaringan kacang tanah dilakukan dengan dua cara yaitu organogenesis dan embriogenesis. Embriogenesis somatik adalah proses menumbuhkan calon tanaman dari sel somatik atau proses regenerasi eksplan melalui pembentukan struktur menyerupai embrio (embrioid) dari sel somatik yang telah memiliki calon akar dan tunas (Purnamaningsih, 2003). Proses embrio somatik secara *in vitro* dipengaruhi oleh kompetensi eksplan untuk membentuk embrio somatik. Induksi embrio somatik pada beberapa tanaman sangat dipengaruhi oleh umur kecambah dari sumber eksplan (Murthy and Saxena, 1994). Hal ini diduga akibat adanya perubahan fisiologis tertentu seperti status hormon selama proses perkecambahan. Perubahan fisiologis tersebut berpengaruh pada kemampuan induksi sel yang kompeten dalam membentuk embrio somatik.

Pada perkecambahan benih tahap awal yang paling penting adalah proses imbibisi. Imbibisi adalah proses masuknya air dari luar benih ke dalam benih

untuk meningkatkan kadar air benih. Peningkatan kadar air benih ini akan memicu perubahan biokimiawi dalam benih sehingga benih dapat berkecambah. Disamping itu, proses imbibisi akan mempengaruhi level hormon endogen yang berperan dalam induksi embrio somatik. Dengan demikian pada penelitian ini akan dipelajari pengaruh periode imbibisi terhadap induksi embrio somatik dua varietas kacang tanah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari bulan November 2011 sampai dengan bulan Maret 2012. Bahan yang digunakan adalah dua varietas kacang tanah nasional yaitu Kancil dan Singa. Bahan-bahan kimia yang dipakai sesuai dengan komposisi media MS (Murashige dan Skoog, 1962).

Percobaan pada setiap varietas dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan pada setiap varietas adalah lama periode imbibisi (0, 20, 40 dan 60 jam). Unit percobaan terdiri dari lima eksplan *leaflet* yang dikulturkan dalam satu botol dan setiap perlakuan diulang 8 kali. Data hasil pengamatan dianalisis ragam pada taraf nyata 5%. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil pada taraf 5%.

Pembuatan Media dan Penanaman

Alat yang digunakan dicuci bersih kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit pada tekanan 1,5 kg/cm² dengan suhu 121°C. Media tanam yang digunakan adalah media MS (Murashige and Skoog, 1962) dengan pikloram 16 µM. Pembuatan media MS dilakukan dengan cara memasukkan larutan stok makro, larutan stok mikro, larutan stok CaCl, larutan stok Fe, larutan stok vitamin MS, larutan stok mioinositol dan larutan stok pikloram ke dalam *beaker glass*. Pada media tersebut ditambahkan sukrosa (30 g/l), lalu ditera hingga satu liter. Setelah itu, pH media diatur sehingga mencapai 5.8. Bahan pematat agar (6 g/l) ditambahkan ke dalam campuran media dan dilarutkan dengan dimasak dan diaduk hingga mendidih selama 10 menit. Media dituang ke dalam botol kultur steril berkapasitas 40 ml. Setelah itu, botol-botol tersebut ditutup dengan *aluminium foil*/plastik dan diikat dengan karet gelang. Setelah itu, botol kultur berisi media disterilkan selama 20 menit dalam *autoclave* yang dipanaskan sampai 121°C dan bertekanan 1.5 kg/cm³.

Benih disterilisasi terlebih dahulu dengan 150 ml air steril ditambah dengan 50 ml natrium hipoklorit 30% dan ±15 tetes larutan *tween* 20 selama 20 menit atau sampai warna kulit benih memutih. Setelah itu, benih dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali hingga benih bersih. Sterilisasi benih dilakukan setiap kali akan melaksanakan perlakuan imbibisi. Setelah benih selesai disterilisasi, benih tersebut diletakkan pada cawan petri berukuran sedang dan diberi air steril hingga seluruh bagian benih terendam air. Setelah itu, cawan ditutup dan dibungkus menggunakan kertas dan diikat dengan karet gelang hingga tertutup rapat kemudian diletakkan pada rak kultur dalam kondisi gelap selama 0, 20, 40 dan 60 jam. Penanaman dilakukan setelah benih selesai diimbibisi dengan mengupas kulit benih kemudian benih kacang tanah dibelah menjadi dua bagian sehingga terlihat bagian *leaflet* kacang tanah. *Leaflet* dipisahkan dari bagian-bagian benih kacang tanah lainnya. *Leaflet* ditanam pada media MS+Pikloram menggunakan pisau skalpel yang sebelumnya telah disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dibakar pada pembakar bunsen. Penanaman dilakukan dengan hati-hati agar eksplan *leaflet* tidak hancur. Proses penanaman dilakukan dalam kondisi aseptik pada *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFc).

Eksplan ditanam dalam media perlakuan sehingga membentuk kalus embriogenik dan embrio somatik. Subkultur dari eksplan ke media yang sama dilakukan setiap empat minggu. Kultur diinkubasikan di dalam ruang kultur yang bersuhu rata-rata 28°C. Selama periode induksi, embrio somatik kultur diinkubasikan dalam kondisi gelap selama 24 jam.

Variabel yang diamati

Pengamatan dilakukan setiap 4 minggu dimulai saat kultur berumur 4 minggu setelah tanam (MST), yaitu saat kultur mulai membentuk kalus embriogenik. Kalus embriogenik didefinisikan sebagai kalus yang menunjukkan adanya perkembangan tahap-tahap pembentukan embrio somatik yaitu sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati. Pengambilan data dilakukan setelah kultur berumur 16 minggu setelah tanam (MST). Embrio yang diamati merupakan embrio primer atau embrio generasi selanjutnya. Dalam percobaan ini variabel yang diamati adalah

- Persentase Eksplan yang Membentuk Embrio Somatik (PEMES) :

$$\text{PEMES} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk embrio somatik}}{\text{Jumlah eksplan per satuan percobaan}} \times 100\%$$

- Rata-rata Jumlah Embrio Somatik per Eksplan (RJESPE)

$$\text{RJESPE} = \frac{\text{Jumlah embrio yang terbentuk pada eksplan.}}{\text{Jumlah eksplan per satuan percobaan.}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan kultur embrio dimulai dengan pembesaran *leaflet*, pembentukan kalus, kalus embriogenik dan embrio somatik (Gambar 1). Eksplan *leaflet* mulai membesar pada umur ± 2 MST, selanjutnya membentuk kalus pada umur ± 4MST dan mulai membentuk kalus embriogenik pada umur ± 6 MST.

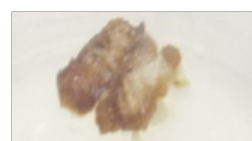
Bentuk embrio somatik dua varietas kacang tanah yang dicoba berbeda. Eksplan *leaflet* yang berasal dari varietas Kancil menghasilkan embrio somatik berukuran besar dan relatif sedikit pada setiap eksplan, sedangkan untuk eksplan *leaflet* yang berasal dari varietas Singa menghasilkan embrio somatik berukuran kecil dan bergerombol pada setiap eksplan-nya (Gambar 2).



Pembesaran leaflet ± 2 MST



Pembentukan kalus ± 4 MST

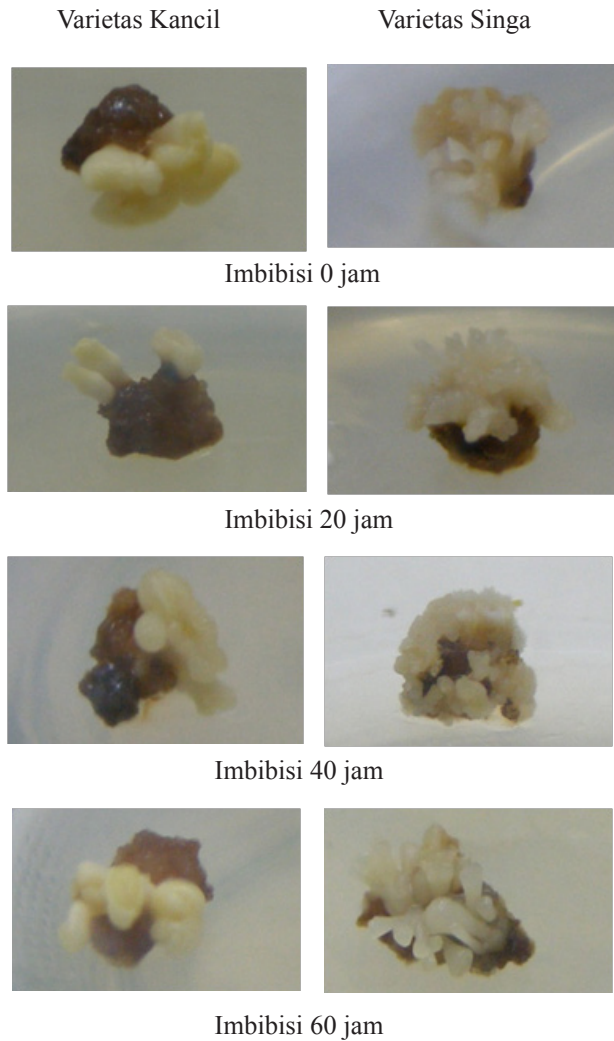


Kalus embriogenik ± 6 MST



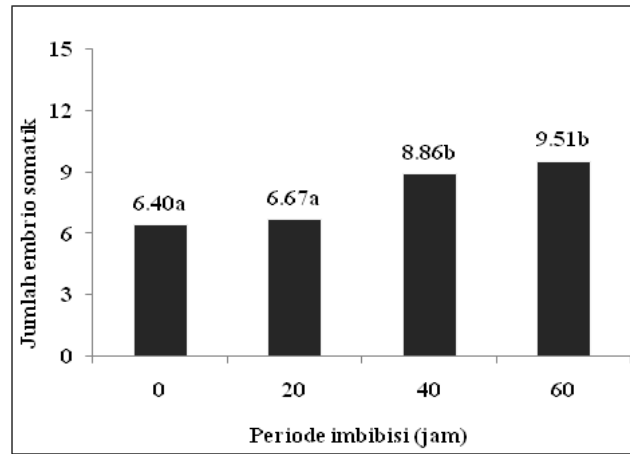
Embrio somatik ≥ 6 MST

Gambar 1. Perkembangan kultur

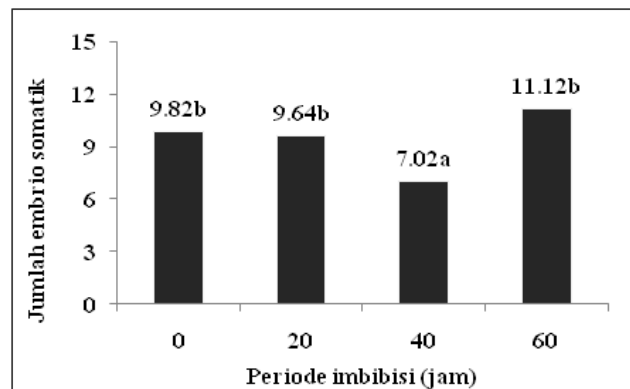


Gambar 2. Embrio somatik kultur *leaflet* kacang tanah pada umur 16 MST

Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan varietas Kancil dari eksplan *leaflet* dengan periode imbibisi 40 dan 60 jam lebih tinggi dibandingkan 0 dan 20 jam. Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan kacang tanah untuk periode imbibisi 20 jam tidak berbeda dengan periode imbibisi 0 jam dan rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan untuk periode imbibisi 60 jam tidak berbeda dengan periode imbibisi 40 jam. Berdasarkan grafik dapat dikatakan bahwa rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan terbaik ditunjukkan oleh periode 40 jam dan 60 jam (Gambar 3). Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan varietas Singa dari eksplan *leaflet* dengan lama imbibisi 0, 20 dan 60 jam lebih tinggi dibandingkan 40 jam. Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan kacang tanah varietas singa dengan periode imbibisi 0, 20 dan 60 jam relatif sama (Gambar 4).



Gambar 3. Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan pada berbagai periode imbibisi terhadap kacang tanah varietas Kancil pada kultur berumur 16 MST

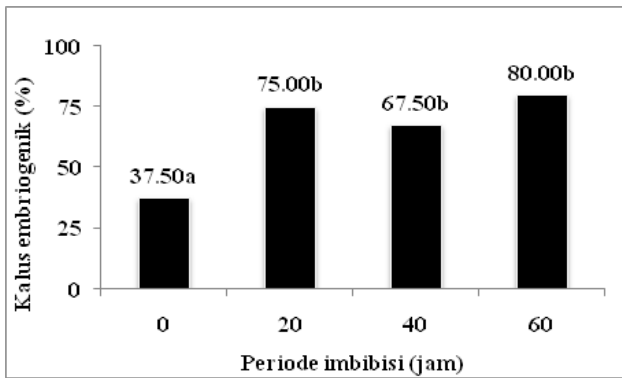


Gambar 4. Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan pada berbagai periode imbibisi terhadap kacang tanah varietas Singa pada kultur berumur 16 MST

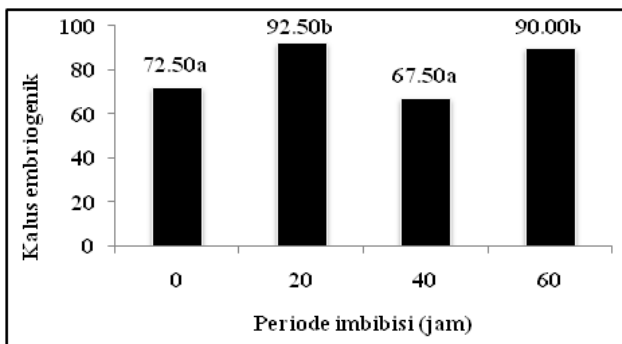
Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik varietas Kancil dari eksplan *leaflet* dengan lama imbibisi 20, 40, dan 60 jam lebih tinggi dibandingkan 0 jam. Persentase kalus embriogenik kacang tanah varietas kancil dengan periode imbibisi 20, 40 dan 60 jam sama. Dengan kata lain, semakin lama periode imbibisi eksplan kacang tanah 20, 40 dan 60 jam tidak meningkatkan kalus embriogenik (Gambar 5).

Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik varietas Singa dari eksplan *leaflet* dengan lama imbibisi 20 dan 60 jam lebih tinggi dibandingkan 0 dan 40 jam. Persentase kalus embriogenik kacang tanah varietas singa dengan periode imbibisi 20 dan 60 jam sama sedangkan rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan yang paling rendah ditunjukkan pada perlakuan lama periode imbibisi 0 dan 40 jam. Berdasarkan grafik diatas dapat disimpulkan bahwa persentase kalus embriogenik yang dihasilkan pada

periode imbibisi 20 jam tidak berbeda dengan periode imbibisi 60 jam (Gambar 6).



Gambar 5. Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik pada berbagai periode imbibisi terhadap kacang tanah varietas Kancil pada kultur berumur 16 MST



Gambar 6. Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik pada berbagai periode imbibisi terhadap kacang tanah varietas Singa pada kultur berumur 16 MST

Penelitian yang dilakukan pada dua varietas secara bersamaan ini ternyata menunjukkan perbedaan hasil yang diperoleh baik dalam segi morfologi embrio maupun dalam segi jumlah embrio yang diperoleh. Perbedaan secara morfologi dapat ditunjukkan bahwa jumlah embrio yang dihasilkan oleh varietas kancil cenderung lebih sedikit dan berukuran besar dibandingkan dengan varietas singa. Hal ini diduga dapat disebabkan oleh perbedaan potensi hasil yang dimiliki oleh kedua varietas tersebut.

Pada penelitian ini jumlah embrio somatik dan persentase eksplan yang membentuk embrio somatik per eksplan kacang tanah yang dihasilkan dipengaruhi oleh lamanya periode imbibisi untuk varietas Kancil, sedangkan untuk varietas Singa tidak dipengaruhi oleh lamanya periode imbibisi. Hal ini diduga adanya perbedaan varietas menentukan perbedaan respon hormon endogen terhadap perubahan biokimiawi dalam sel saat peristiwa imbibisi yang terjadi pada dua varietas kacang tanah tersebut.

Menurut Dewi (2008) hormon tumbuhan merupakan bagian dari proses regulasi genetik dan berfungsi sebagai prekursor. Rangsangan lingkungan memicu terbentuknya hormon tumbuhan. Bila konsentrasi hormon telah mencapai tingkat tertentu, sejumlah gen yang semula tidak aktif akan mulai ekspresi. Dengan kata lain, imbibisi dapat memicu perubahan level hormon endogen ke arah yang sesuai dalam membentuk embrio somatik. Proses perkecambahan mempengaruhi level dari auksin dan sitokinin yang berperan dalam proses embriogenesis. Meskipun demikian, bagaimana proses perubahan zat pengatur tumbuh tersebut tidak diketahui (Murthy *et al.*, dalam Edy, 2009).

KESIMPULAN

1. Periode imbibisi berpengaruh terhadap peningkatan jumlah embrio somatik per eksplan dan persentase kalus embriogenik pada dua varietas yang dicoba.
2. Periode imbibisi terbaik dalam menghasilkan rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan adalah 40 jam (8.86) untuk varietas Kancil dan 0 jam (9.82) untuk varietas Singa. Sedangkan periode imbibisi terbaik dalam menghasilkan persentase kalus embriogenik adalah 20 jam (75.00) untuk varietas Kancil dan 20 jam (92.50) untuk varietas Singa.

DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, I.R. 2008. Peranan dan Fungsi Fitohormon bagi Pertumbuhan Tanaman. Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran. Bandung.
- Edy, A. 2008. Pengaruh umur kecambah sumber eksplan leaflet terhadap induksi embrio somatik pada beberapa varietas kacang tanah secara in vitro. Prosiding Seminar Nasional SMAP 2009. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Murashige, T. dan F. Skoog. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth dan Bioassay With Tobacco Tissue Cultures. *Physiology Plant.* 15 : 473 – 479.
- Murthy B.N.S. and P.K. Saxena. 1994. Somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L): Stimulation of direct differentiation of somatic embryos by forchlorfenuron (CPPU). *Plant Cell Report* 14:145-150.
- Purnamaningsih R. 2003. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik Dan Beberapa Gen Yang Mengendalikannya. *Buletin Agrobio* 5(2):51-58.