

**SELEKSI IN VITRO KALUS KEDELAI (*Glycine max* L.) HASIL INDUKSI
MUTASI MENGGUNAKAN ETIL METAN SULFONAT TOLERAN
KEKERINGAN DAN ALUMINIUM**

***IN VITRO SELECTION OF SOYBEAN (*Glycine max* L.) CALLUS RESULTS OF
MUTATION INDUCTION USING ETHYL METHANE SULFONATE TOLERANT
TO DROUGHT AND ALUMINIUM***

**Gustian¹, Muhammad Rafli Ibrahim², Benni Satria³, Ryan Budi Setiawan⁴, ¹Silvia
Permata Sari⁵**

**^{1,2,3,4} Program Studi Agroteknologi, Departemen Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas
Andalas, Sumatera Barat, Indonesia.**

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L.) is a type of nutritious food crop because soybean seeds have high protein amino acid content. Increasing domestic production for soybean self-sufficiency needs to be done by expanding the planting area. The objective of this research is to examine the effect of ethyl methane sulfonate concentration and obtain soybean plants tolerant to drought and aluminum stress through in vitro selection. This research was conducted from November 2023 to January 2024 at the Tissue Culture Laboratory, Faculty of Agriculture, Andalas University. The research was arranged in a Completely Randomized Design consisting of 12 treatment levels of the combination of concentrations of abiotic selection agents PEG 4000 and AlCl₃ induced by EMS mutation and 12 treatment levels of the combination of concentrations of abiotic selection agents PEG 4000 and AlCl₃ not induced by EMS mutation with 3 replications. Data analysis was performed using independent sample t-test at a significance level of 5% and interpreted descriptively. The results showed that mutation induction using ethyl methane sulfonate (EMS) did not produce soybean somatic embryo mutants tolerant to drought and aluminum stress. Meanwhile, results from non-mutated callus produced somatic embryos suspected to be potential putative somaclonal candidates tolerant to drought and aluminum after double in vitro selection using 10% PEG 4000 and 150 ppm AlCl₃ selection agents.

Keywords: Soybean, Ethyl Methane Sulfonate, In Vitro Selection, PEG, AlCl₃

INTISARI

Kedelai (*Glycine max* L.) adalah jenis tanaman bahan pangan bergizi karena biji kedelai memiliki kandungan asam amino protein yang tinggi. Peningkatan produksi dalam negeri supaya swasembada kedelai perlu dilakukan dengan cara perluasan areal tanam. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh konsentrasi etil metan sulfonat dan mendapatkan tanaman kedelai yang toleran pada kondisi kekeringan dan cekaman aluminium melalui seleksi in vitro. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2023 sampai Januari 2024 di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 12 taraf perlakuan kombinasi konsentrasi agen seleksi abiotik PEG 4000 dan AlCl₃ yang diinduksi mutasi EMS dan 12 taraf perlakuan kombinasi konsentrasi agen seleksi abiotik PEG 4000 dan AlCl₃ yang tidak diinduksi mutasi EMS dengan 3 kali ulangan. Analisis data dengan uji t sampel independen pada taraf nyata 5% dan diinterpretasikan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bahwa induksi mutasi menggunakan etil metan sulfonat (EMS) tidak menghasilkan embrio somatik mutan kedelai yang toleran terhadap kekeringan dan cekaman aluminium. Sementara itu hasil kalus tanpa induksi mutasi menghasilkan embrio somatik yang diduga menjadi kandidat somaklon

¹ corresponding author: Silvia Permata Sari. Email: silvia@agr.unand.ac.id

putatif toleran kekeringan dan aluminium setelah dilakukan seleksi ganda in vitro menggunakan agen seleksi PEG 4000 10 % dan AlCl_3 150 ppm.

Kata kunci: Kedelai, Etil Metan Sulfonat, Seleksi In Vitro, PEG, AlCl_3

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan jenis tanaman pangan yang kaya nutrisi karena bijinya mengandung tinggi asam amino protein. Biji kedelai sangat diminati di Indonesia untuk diolah menjadi berbagai produk makanan dan minuman sebagai pengganti protein hewani (Riniarsi, 2020). Permintaan kedelai terus meningkat seiring pertumbuhan penduduk dan tingginya minat masyarakat terhadap produk kedelai ini. Produktivitas kedelai di dalam negeri masih rendah dan belum mampu memenuhi permintaan pasar, sehingga Indonesia harus melakukan impor kedelai setiap tahunnya. Pada tahun 2020, volume impor kedelai mencapai 2.475.286 kg dan pada tahun 2021 meningkat menjadi 2.489.690 kg (BPS, 2022).

Pengembangan varietas kedelai melalui pemuliaan tanaman dilakukan untuk memperbaiki genetik tanaman dan meningkatkan produksi kedelai dalam negeri. Kementerian Pertanian Indonesia sampai saat ini telah banyak melepas varietas unggul tanaman kedelai, salah satunya adalah varietas Dega 1. Varietas Dega 1 merupakan varietas yang berasal dari persilangan dengan tujuan sebagai perbaikan varietas Grobogan (Susanto dan Nugrahaeni, 2017). Varietas Dega telah dilepas oleh Kementerian Pertanian Indonesia pada tahun 2015 dan diakui sebagai salah satu varietas kedelai unggul. Potensi hasilnya diperkirakan mencapai 3,80 ton per hektar. Karakteristik tersebut menunjukkan potensi untuk ditingkatkan melalui peningkatan keragaman genetik pada genotip baru. Peningkatan keragaman dapat dilakukan dengan cara induksi mutasi. Induksi mutasi digunakan sebagai upaya untuk memperluas keragaman genetik misalnya menggunakan senyawa kimia yang mampu merubah gen

atau kromosom tanaman (Rasyad & Fiarahman, 2022).

Pengembangan tanaman kedelai di ultisol dapat ditingkatkan melalui penggunaan varietas unggul. Salah satu kriteria yang menentukan varietas sebagai unggul adalah kemampuannya untuk meningkatkan hasil produksi. Perakitan varietas unggul dapat dilakukan dengan teknik pemuliaan tanaman diantaranya persilangan, mutasi dan rekayasa genetika. Di antara cara-cara tersebut mutasi merupakan salah satu cara yang dipandang paling murah dan cepat dalam upaya peningkatan keanekaragaman genetik tanaman. Pemuliaan mutasi tanaman telah menghasilkan banyak varietas unggul. Purnamaningsih et al. (2016) melaporkan bahwa induksi mutasi pada tanaman kedelai dapat dilakukan menggunakan mutagen fisik seperti sinar gamma maupun kimia mutagen kimia seperti Etil Metan Sulfonat (EMS). EMS digunakan sebagai mutagen karena bersifat alkali sehingga dapat menyebabkan perubahan pasangan basa nitrogen dan tidak bersifat mutagenik setelah terhidrolisis. Induksi mutasi lebih efektif dilakukan pada populasi sel somatik seperti kalus, karena sel-sel tersebut masih memiliki karakteristik meristematik yang dapat meningkatkan keragaman genetik pada setiap sel untuk memperoleh mutan solid tanpa terjadinya kimera. Dengan menggunakan EMS untuk induksi mutasi, diharapkan dapat menghasilkan mutan kedelai yang toleran terhadap tanah ultisol yang cenderung memiliki faktor pembatas abiotik, seperti cekaman kekeringan dan kandungan aluminium yang tinggi.

Berdasarkan penelitian Purnamaningsih et al. (2016) bahwa perendaman mutagen EMS (Etil Metan Sulfonat) 0,5% selama 1 jam pada dua genotip kedelai dapat menurunkan persentase kalus bertahan hidup

sebesar 50% (LC50) dan rata-rata regenerasi membentuk struktur torpedo berkurang sehingga diduga merupakan kalus mutan putatif. Keberhasilan induksi mutasi EMS menghasilkan mutan kedelai yang diharapkan dapat diketahui melalui seleksi in vitro terlebih dahulu. Metode seleksi ini lebih cepat, tidak tergantung faktor eksternal seperti hujan dan penyinaran matahari, serta dapat menghasilkan individu tanaman dalam jumlah yang lebih banyak. Seleksi in vitro menggunakan agen penyeleksi PEG dan $AlCl_3$ yang ditambahkan pada media kultur. Konsentrasi PEG 10, 20 dan 30% merupakan konsentrasi yang biasa digunakan untuk simulasi cekaman kekeringan dilapang. Husni et al. (2006) melaporkan bahwa seleksi in vitro dengan penambahan PEG 20 % dapat digunakan sebagai metode seleksi untuk toleransi kekeringan pada kedelai. Saepudin et al. (2016) melaporkan bahwa PEG 4000 yang digunakan berdasarkan kesetaraan nilai potensial osmotik menurut Michel & Kaufmann (1975) yaitu : PEG 0 % (0.00 Mpa), PEG 5 % (-0.13 Mpa), PEG 10 % (-0.19 Mpa), PEG 15 % (-0.41 Mpa), dan PEG 20 % (-0.67 Mpa) didapatkan bahwa kalus embriogenik yang masih segar (surviving callus) dihasilkan pada 20 % PEG namun merupakan jumlah kalus embriogenik terendah secara signifikan dibanding ketiga konsentrasi PEG 5 %, 10 % dan 15 %.

Seleksi massa sel embriogenik tanaman kedelai terhadap ketahanan terhadap aluminium (Al) dilakukan dengan menumbuhkan kalus embriogenik pada media yang mengandung $AlCl_3$ untuk menciptakan cekaman terhadap Al dengan konsentrasi yang mampu menimbulkan sifat toksisitas Al. Untuk merancang media seleksi in vitro, penting untuk mengetahui konsentrasi subletal yang cukup untuk memisahkan sel atau jaringan yang tahan dan yang tidak tahan terhadap kondisi seleksi dengan aluminium, khususnya pada pH yang rendah. Penggunaan media yang mengandung $AlCl_3$ pada kondisi media pH 4 diharapkan dapat menyeleksi

massa sel-sel kalus tanaman kedelai untuk ketahanan aluminium. Saepudin, et al. (2016) menyatakan bahwa penggunaan konsentrasi $AlCl_3$ hingga 200 ppm didapatkan kalus embriogenik maupun embrio somatik tetap hidup (survive), diduga hal ini menunjukkan terdapatnya sifat toleransi (putatif) terhadap Al (tanah masam). Berdasarkan uraian di atas penulis telah melaksanakan penelitian mengenai “Seleksi In Vitro Kedelai (*Glycine max* L.) Hasil Induksi Mutasi Menggunakan Etil Metan Sulfonat Toleran Kekeringan dan Aluminium”.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Percobaan ini telah dilaksanakan pada bulan November 2023 sampai bulan Januari 2024 di Laboratorium Kultur Jaringan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas.

Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam percobaan ini meliputi beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, botol kultur, scalpel, pinset, gunting, laminar air flow cabinet (LAFB), timbangan analitik, pipet tetes, autoklaf, bunsen, hand sprayer, pH meter, hot plate, magnetic stirrer, tissue, pemanik api, mikropipet, gunting, spatula, alat tulis dan alat dokumentasi. Bahan yang akan digunakan dalam percobaan ini adalah kalus kedelai varietas Dega 1, alkohol 96%, alkohol 70%, akuades, media dasar Murashige. Skoog (MS), sukrosa, 2,4-dichlorophenoxy acid (2,4-D), pure agar, aluminium foil, plastik kaca, Etil Metan Sulfonat (EMS), PEG 4000 dan $AlCl_3$, spritus, syringe filter 0,22 micron disposable, suntik 5 ml, tisu, karet, NaOCl 5,25 %, dan deterjen cair.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), terdiri dari 24 taraf perlakuan

kombinasi konsentrasi agen seleksi abiotik PEG 4000 dan $AlCl_3$ yang mana 12 taraf perlakuan diinduksi mutasi EMS dan 12 taraf perlakuan perlakuan tidak diinduksi mutasi EMS, yaitu: a) 0 % PEG + 0 ppm $AlCl_3$; b) 5 % PEG + 0 ppm $AlCl_3$; c) 10 % PEG + 0 ppm $AlCl_3$; d) 0 % PEG + 50 ppm $AlCl_3$; e) 0 % PEG + 100 ppm $AlCl_3$; f) 0 % PEG + 150 ppm $AlCl_3$; g) 5 % PEG + 50 ppm $AlCl_3$; h) 5 % PEG + 100 ppm $AlCl_3$; i) 5 % PEG + 150 ppm $AlCl_3$; j) 10 % PEG + 50 ppm $AlCl_3$; k) 10 % PEG + 100 ppm $AlCl_3$; l) 10 % PEG + 1500 ppm $AlCl_3$. Percobaan diulang 3 kali sehingga diperoleh 72 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdapat 10 botol sehingga dibutuhkan 720 botol. Setiap botol kultur ditanam 2 kalus.

Prosedur

Adapun prosedur penelitian meliputi sterilisasi alat dan lingkungan kerja, induksi kalus, induksi mutasi etil metan sulfonat, seleksi in vitro kalus kedelai, proliferasi embrio somatik, pemeliharaan, pengamatan, dan analisis data. Pertama, botol kultur dan alat bantu tanam dicuci dengan sabun dan dibilas hingga bersih sebelum dikeringkan. Setelah itu, alat bantu tanam yang akan disterilisasi perlu dibungkus menggunakan kertas HVS. Sterilisasi botol dan alat bantu tanam dilakukan menggunakan autoclave pada tekanan 0,1 Mpa dengan suhu $121^{\circ}C$, dan dipertahankan selama 20 menit. Sebelum digunakan, semua alat tanam yang diperlukan disemprot terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam kotak LAFC. Kemudian, alat tanam yang akan digunakan direndam dalam alkohol 96% dan dibakar menggunakan api bunsen beberapa saat sebelum digunakan.

Ruangan yang akan digunakan, seperti ruang pembuatan media, inkubasi, dan penanaman, harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu untuk sterilisasi. LAFC harus disterilkan dengan menggunakan sinar UV selama 1 jam sebelum digunakan. Selanjutnya, LAFC harus disemprot kembali

menggunakan alkohol 70% setiap kali sebelum digunakan dan setelah digunakan.

Eksplan yang digunakan dalam induksi kalus berasal dari kotiledon muda kedelai varietas Dega yang berusia sekitar ± 14 hari setelah antesis. Kotiledon tersebut memiliki ukuran sekitar 3-5 mm, berwarna hijau, dan masih dalam keadaan lunak. Proses sterilisasi dilakukan dengan merendam polong kedelai menggunakan larutan Natrium hipoklorit (5,25% $NaOCl$) selama 20 menit. Setelah itu, polong kedelai dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 4 kali untuk membersihkannya.

Induksi kalus dilakukan menggunakan media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D 10 ppm dan sukrosa berdasarkan metode Nastiti (2022). Pembuatan media menggunakan erlemeyer berukuran 1 liter, yang ditambahkan akuades steril sebanyak 200 ml dan dimasukkan magnetic stirrer ke dalam tabung. Erlenmeyer kemudian diletakkan di atas hotplate. Pengecekan pH yang diinginkan untuk media kultur adalah 5,8. Media yang sudah memiliki derajat keasaman yang tepat kemudian dicukupkan volumenya menjadi 1 liter dengan penambahan akuades steril. Bahan pematat yang digunakan dalam pembuatan media adalah agar sebanyak 7 g/l.

Media dihomogenkan selama 5 menit sebelum dipanaskan di atas hotplate. Pemanasan dilakukan sampai mendidih. Media yang sudah mendidih kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur dengan volume 10 ml/botol. Botol kemudian ditutup menggunakan plastik dan leher botol diikat dengan karet gelang. Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu $121^{\circ}C$ pada tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit, setelah itu media dipindahkan ke ruangan inkubasi. Media diletakkan dalam ruangan inkubasi selama satu minggu untuk melihat media tersebut terkontaminasi atau tidak. Media yang terkontaminasi harus segera dipindahkan agar tidak terjadi penularan kontaminasi pada media lain.

Penanaman dilakukan dengan meletakkan 4 embrio zigotik untuk satu botol yang berisi media menggunakan pinset. Mulut botol dibakar pada api bunsen beberapa saat sebelum ditutup menggunakan plastik bening dan diikat dengan karet gelang. Botol kemudian dilapisi menggunakan plastik wrap untuk mengantisipasi terjadinya kontaminasi. Botol-botol yang telah selesai, kemudian diletakkan di rak kultur. Ruang inkubasi diatur pada kondisi gelap suhu ruangan 23°C-25°C. Jumlah kalus embriogenik yang harus dipersiapkan sebanyak 1500 kalus. Induksi kalus embriogenik dilakukan selama 4 minggu.

Kalus yang dihasilkan dari kultur in vitro diinduksi mutasi pada larutan etil metan sulfonat dengan dasar LC50 yaitu konsentrasi 0,5% selama 60 menit. Larutan etil metan sulfonat dilarutkan dengan memipet sebanyak 0,5 ml kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 100 ml. Sterilisasi EMS dilakukan dengan menggunakan microsiringe disposable dan penyinaran sinar ultra violet selama 30 menit. Induksi mutasi dilakukan dengan cara kalus embriogenik direndam dalam larutan etil metan sulfonat dalam petridish di dalam LAFC selama 1 jam. Kalus yang telah direndam EMS dikultur pada media MS + agar tanpa ZPT. Kalus diinkubasi selama satu minggu di ruang kultur sebelum dilakukan seleksi in vitro.

Kalus yang diinduksi mutasi EMS dan yang tidak diinduksi mutasi kemudian diseleksi secara in vitro menggunakan agen seleksi abiotik PEG 4000 dan AlCl₃. Bahan PEG dilarutkan dengan aquadest steril 200 ml untuk konsentrasi 50% sebagai larutan stok PEG. AlCl₃ dilarutkan dengan aquades steril 200 ml untuk konsentrasi 2000 ppm sebagai larutan stok AlCl₃. Media seleksi dibuat dengan cara media MS + sukrosa + 2,4 D dihomogenkan dengan aquades 400 ml dalam erlenmeyer. Pure agar ditambahkan sebanyak 12 g/l sebagai pematat. Aquades ditambahkan mencapai 1 liter. Media dihomogenkan selama 15 menit sebelum dipanaskan diatas

hotplate. Pemanasan dilakukan sampai mendidih. Media tersebut dituangkan ke dalam beaker glass yang berisi PEG dan AlCl₃ (sesuai konsentrasi yang dibutuhkan), kemudian dihomogenkan dan di masukkan kedalam botol kultur sebanyak 10 ml. Setiap botol ditutup dengan plastik bening dan diikat dengan karet gelang. Setelah media yang digunakan telah siap, maka media tersebut disterilkan dengan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 0,1 Mpa. Media diletakkan dalam ruangan inkubasi selama satu minggu untuk melihat media tersebut terkontaminasi atau tidak. Penanaman dilakukan dengan meletakkan 2 kalus yang telah dimutasi dan yang tidak dimutasi di botol kultur yang berisi media agen seleksi abiotik PEG 4000 dan AlCl₃ menggunakan pinset. Mulut botol dibakar pada api bunsen beberapa saat sebelum ditutup menggunakan plastik bening dan diikat dengan karet gelang. Botol kemudian dilapisi menggunakan plastik wrap untuk mengantisipasi terjadinya kontaminasi. Botol-botol yang telah selesai, kemudian diletakkan di rak kultur. Ruang inkubasi diatur pada kondisi gelap suhu ruangan 23°C-25°C. Waktu untuk seleksi dilakukan selama 8 minggu.

Proliferasi embrio somatik dilaksanakan dengan melakukan subkultur embrio somatik yang telah terbentuk dari seleksi in vitro. Media yang digunakan untuk subkultur merupakan media 20 ppm 2,4-D + 10 ppm NAA. Embrio somatik yang terbentuk disubkultur dengan posisi menyentuh media tanam. Botol kemudian disimpan pada rak kultur dengan kondisi gelap dan dilakukan pengamatan selama 4 minggu.

Pemeliharaan dilakukan dengan tetap menjaga kebersihan rak kultur dan ruang inkubasi. Eksplan atau media yang terkontaminasi dipisahkan dan dikeluarkan dari rak kultur untuk meminimalisir penularan kontaminasi pada botol kultur lainnya. Kontaminasi ditandai dengan adanya lendir pada media, bercak-bercak, dan hifa pada media maupun eksplan. Pemeliharaan

dilakukan dengan menyemprot botol kultur dan sekitar rak-rak kultur yang digunakan sebagai tempat meletakkan botol kultur menggunakan alkohol 70%. Botol-botol berisikan eksplan diamati setiap hari. Eksplan yang terkontaminasi harus dipisahkan kemudian dicatat dan setiap perkembangan eksplan didokumentasikan menggunakan kamera.

Adapun variabel pengamatan percobaan ini adalah persentase kalus hidup (%), warna kalus, dan jumlah kalus yang menghasilkan embrio somatik. Hasil pengamatan percobaan yang diperoleh dihitung nilai rata-rata data kuantitatif dan diolah secara statistik menggunakan uji t sampel independen pada

taraf nyata 5%. Analisis data menggunakan software Statistical Tool for Agricultural Research (STAR). Data kualitatif diinterpretasikan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Kalus yang Bertahan Hidup

Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa persentase kalus yang bertahan hidup semakin menurun setiap peningkatan kadar konsentrasi PEG 4000 dan $AlCl_3$ dalam media (Tabel 1). Kalus yang hidup memiliki ciri-ciri seperti kondisi kalus yang segar, terjadinya pertumbuhan clump, berwarna kuning terang dan tidak terkontaminasi.

Tabel 1. Persentase Kalus yang Bertahan Hidup Pada Media Seleksi PEG 4000 dan $AlCl_3$

Perlakuan	Mutasi EMS 0,5 % (%)	Non-Mutasi (%)
0% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	38,33 ± 5,77*	81,67 ± 12,60
0% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	26,67 ± 2,89 ^{tn}	55,00 ± 8,66
0% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	11,67 ± 2,89 ^{tn}	43,33 ± 7,64
0% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	11,67 ± 7,64*	30,00 ± 5,00
5% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	25,00 ± 5,00*	55,00 ± 13,20
10% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	25,00 ± 5,00*	36,67 ± 5,77
5% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	11,67 ± 7,64*	30,00 ± 5,00
5% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	16,67 ± 7,64 ^{tn}	32,78 ± 2,55
5% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	8,33 ± 10,40 ^{tn}	21,67 ± 5,77
10% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	10,00 ± 5,00*	25,00 ± 5,00
10% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	3,33 ± 2,89*	21,67 ± 2,89
10% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	3,33 ± 5,77 ^{tn}	18,33 ± 2,89

Ket : *= berbeda nyata dari kalus tanpa mutasi pada taraf 5% dengan uji t student
tn= tidak berbeda nyata dari kalus tanpa mutasi pada taraf 5% dengan uji t student

Hasil percobaan perendaman kalus kedelai dengan perlakuan EMS 0,5% selama 60 menit menyebabkan kematian kalus lebih tinggi dibandingkan dengan kalus tanpa perlakuan EMS. Penurunan persentase kalus yang bertahan hidup pada media kontrol menunjukkan bahwa EMS dapat merusak sel. Penambahan PEG 4000 10% dan $AlCl_3$ 150 ppm pada media MS mengakibatkan kalus non-mutasi dan mutan putatif mengalami pertumbuhan terhambat dan kematian yang signifikan, sebagaimana diperlihatkan dalam Tabel 1.

EMS dapat mempengaruhi terjadinya penghambatan pada pembelahan sel, yang pada gilirannya dapat menyebabkan kematian sel tanaman. Penghambatan berturut-turut pada sel dapat mengakibatkan kematian sel karena mutagen kimia, seperti EMS, secara langsung berinteraksi dengan sel tanaman, menyebabkan perendaman yang bersifat toksik. Hal ini mengakibatkan sel tidak mampu berproliferasi untuk membentuk kalus. Menurut Purnamaningsih et al. (2014), kematian pada kalus disebabkan oleh tingginya konsentrasi EMS, yang dapat merusak promotor pertumbuhan,

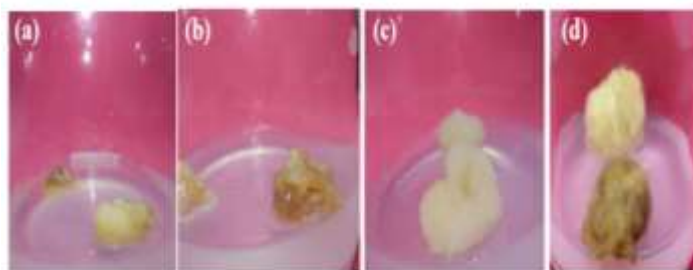
meningkatkan penghambat pertumbuhan dan metabolisme, serta menyebabkan kerusakan pada penyimpanan kromosom.

Hasil seleksi in vitro menggunakan PEG 4000 10% juga dilaporkan pada penelitian kalus kedelai (Saepudin, 2014). Perlakuan cekaman 15% PEG 4000 efektif untuk seleksi tanaman toleran kekeringan pada kacang tanah (Rahayu & Sudarsono 2015), kultur kalus terong (*Solanum melongena*) 15% PEG 4000 juga efektif untuk seleksi toleran kekeringan secara in vitro (Sinaga et al., 2015), serta tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) (Suhesti, 2015). Penurunan pertumbuhan kalus yang disebabkan oleh pemberian PEG 4000 terjadi karena penurunan potensial osmotik air dalam media kultur, yang menghambat sel untuk mengambil air dan nutrisi. PEG 4000 memiliki kemampuan untuk menghambat air sedemikian rupa sehingga sel-sel somatik tidak dapat menyerap air, kecuali jika mereka memiliki mekanisme khusus. Kalus yang dapat bertahan hidup dalam media seleksi PEG 4000 dianggap memiliki toleransi yang lebih baik terhadap cekaman kekeringan. Penggunaan PEG 4000 dalam kultur in vitro dapat mensimulasikan penurunan potensial air tanah dan menciptakan kondisi kekeringan. Penurunan potensial air ini tergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG yang digunakan.

PEG diketahui tidak menyebabkan kerusakan fisik atau memiliki efek toksik

langsung pada tanaman. Namun, PEG dapat menghambat pertumbuhan tanaman dengan menurunkan potensial air media, sehingga eksplan yang dikulturkan tidak dapat menyerap air dengan efisien. Penurunan pertumbuhan kalus kemungkinan disebabkan oleh menurunnya volume vakuola dan sitoplasma akibat kehilangan air dari sitoplasma, karena penurunan potensial air sel. Penurunan potensial osmotik di luar sel (eksternal) menjadi penghambat bagi sel untuk menyerap air dan nutrisi dari lingkungan eksternal, sehingga pertumbuhan terhambat (Saepudin, 2014).

Persentase kelangsungan hidup kalus menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi $AlCl_3$, menunjukkan bahwa kalus tidak toleran terhadap pertumbuhan pada pH rendah (pH 4). Kalus mutan yang tumbuh pada media dengan $AlCl_3$ 50 ppm menunjukkan persentase kelangsungan hidup tertinggi, meskipun lebih rendah dibandingkan dengan kalus tanpa induksi mutasi EMS. Menurut penelitian Yuliasti dan Sudarsono (2011), perendaman dengan EMS mempengaruhi kemampuan kalus untuk meregenerasi dan mengungkapkan mekanisme toleransi sel terhadap ketersediaan Al yang tinggi di permukaan media seleksi. Peningkatan konsentrasi Al juga mengakibatkan penurunan pertumbuhan kalus dan pembentukan tunas.

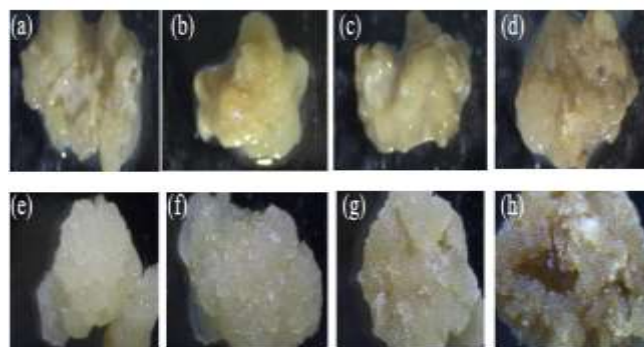


Gambar 1. Morfologi Kalus pada media cekaman abiotik; (a) kalus bertahan hidup yang diinduksi mutasi, (b) kalus mati yang diinduksi mutasi, (c) kalus bertahan hidup tanpa induksi mutasi, (d) kalus mati tanpa induksi mutasi.

Kalus yang masih bertahan hidup juga terbentuk pada kombinasi perlakuan terendah dari PEG 4000 dan AlCl_3 . Namun, persentase kalus yang bertahan hidup masih signifikan lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Kalus yang dapat bertahan hidup menunjukkan kemampuan untuk bertahan dalam lingkungan cekaman, mungkin disebabkan oleh perubahan genetik setelah diinduksi mutasi menggunakan etil metan sulfonat. Kalus yang bertahan hidup diduga merupakan kalus mutan yang mampu bertahan hidup dalam kondisi tersebut.

Warna Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan selama 8 MSK diperoleh bahwa pemberian kombinasi konsentrasi PEG dan AlCl_3 sebagai agen seleksi abiotik berpengaruh terhadap daya toleransi kalus melalui perubahan warna kalus. Peningkatan konsentrasi agen seleksi abiotik pada media menyebabkan perubahan warna kalus berdasarkan skoring pada Gambar 2. Kalus mengalami peningkatan kematian akibat cekaman kombinasi konsentrasi PEG 4000 dan AlCl_3 ditandai dengan perubahan warna menjadi cokelat kehitaman.



Gambar 2. Skoring penampilan kalus kedelai pada media cekaman PEG 4000 dan AlCl_3 menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 40x; (a) Skor 1 kalus dengan mutasi, (b) Skor 2 kalus dengan mutasi, (c) Skor 3 kalus dengan mutasi, (d) Skor 4 kalus dengan mutasi, (e) Skor 1 kalus tanpa mutasi, (f) Skor 2 kalus tanpa mutasi, (g) Skor 3 kalus tanpa mutasi, (h) Skor 4 kalus tanpa mutasi.

Kalus hasil induksi mutasi EMS diseleksi pada media yang sama dengan kalus yang tidak dilakukan mutasi. Warna kalus non mutan hampir seluruhnya berwarna putih, cokelat dan strukturnya lebih kompak sedangkan kalus yang diinduksi mutasi lebih banyak berwarna kuning, cokelat, hitam dan remah sesuai dengan Gambar 2. Hal ini menunjukkan bahwa EMS menimbulkan

penurunan kemampuan kalus untuk terus hidup dan beregenerasi sehingga ketika dalam kondisi cekaman PEG dan AlCl_3 pada pH rendah, kalus ini tidak mampu bertahan hidup dan mengalami perubahan warna. Hasil seleksi menunjukkan bahwa persentase perubahan warna kalus tertinggi terdapat pada skoring 4.



Gambar 3. Diagram Persentase Skoring Perubahan Warna Kalus Hasil Non Mutasi ; P1 = 0 % PEG + 0 ppm AlCl₃, P2 = 5 % PEG + 0 ppm AlCl₃, P3= 10 % PEG + 0 ppm AlCl₃, P4 = 0 % PEG + 50 ppm AlCl₃, P5 = 0 % PEG + 100 ppm AlCl₃, P6 = 0 % PEG + 150 ppm AlCl₃, P7 = 5 % PEG + 50 ppm AlCl₃, P8 = 5 % PEG + 100 ppm AlCl₃, P9 = 5 % PEG + 150 ppm AlCl₃, P10 = 10 % PEG + 50 ppm AlCl₃, P11= 10 % PEG + 100 ppm AlCl₃, P12 = 10 % PEG + 150 ppm AlCl₃

Sari *et al.* (2016) menegaskan bahwa penentuan konsentrasi dan durasi perendaman EMS sangat krusial untuk mencapai keberhasilan dalam mendapatkan varian mutan yang diinginkan. Semakin lama perendaman dan semakin tinggi konsentrasinya, maka semakin sedikit kalus yang dapat bertahan hidup, dengan warna kalus cenderung berubah menjadi cokelat. Kalus yang mengalami seleksi pada media cekaman abiotik mengalami penurunan dalam proliferasi dan kematian sel, yang mengakibatkan perubahan warna menjadi cokelat tua dan ketidakmampuan untuk bertahan hidup. Hal ini menunjukkan bahwa media seleksi memberikan hambatan terhadap pertumbuhan kalus, yang semakin kuat seiring dengan peningkatan konsentrasi media seleksi. Perubahan warna pada kalus juga diamati selama seleksi *in vitro* pada beberapa genotipe kedelai (Saepudin, 2014), yang menyatakan bahwa kalus yang tidak segar cenderung mengalami perubahan warna menjadi cokelat dan akhirnya mati. Pencokelatan pada jaringan dan kematian kalus diduga terjadi karena kehilangan air

yang disebabkan oleh stres osmotik (seperti PEG) dalam media seleksi. Kehilangan air juga dapat mengurangi kelarutan fenol pada kalus, yang menyebabkan peningkatan kandungan senyawa fenol dan akhirnya pencokelatan atau kematian kalus.

Pertumbuhan kalus terhambat secara signifikan pada media yang ditambahkan dengan AlCl₃ dibandingkan dengan media tanpa penambahan AlCl₃. Kalus yang mengalami tekanan akibat keracunan aluminium menunjukkan gejala nyata, yaitu perubahan warna dari putih atau kuning menjadi cokelat, yang pada akhirnya mengalami kematian dan terhambatnya ukuran kalus, seperti yang terlihat dalam Gambar 2. Kemungkinan besar, hal ini disebabkan oleh paparan Al yang tinggi, yang menyebabkan keracunan pada kalus. Kalus umumnya mengaktifkan mekanisme pertahanan terhadap cekaman, termasuk pembentukan senyawa fenol yang seringkali diikuti oleh perubahan warna kalus menjadi cokelat. Dengan demikian, penambahan AlCl₃ ke dalam media kultur terbukti efektif dalam menekan pertumbuhan sel dalam

jaringan kalus. Laju pertumbuhan ukuran kalus juga terhambat secara signifikan, bahkan pada konsentrasi Al yang tinggi, kalus yang tidak toleran mengalami kematian. Penelitian oleh Damayanti et al. (2017) pada kalus tanaman tebu juga menunjukkan respons serupa terhadap cekaman Al, dengan perubahan warna kalus menjadi cokelat atau hitam yang akhirnya mengalami kematian.

Jumlah Kalus yang Menghasilkan Embrio Somatik (%)

Berdasarkan hasil pengamatan selama 8 minggu setelah kultur (msk) diperoleh bahwa pemberian kombinasi konsentrasi PEG dan $AlCl_3$ sebagai agen seleksi abiotik tidak menghasilkan embrio somatik pada setiap kalus yang diseleksi. Peningkatan konsentrasi agen seleksi abiotik akan menurunkan kemampuan regenerasi. Regenerasi akan menurun apabila massa sel yang dikulturkan pada media yang mempunyai komponen

seleksi yang umumnya bersifat toksik sehingga tidak terbentuknya embrio somatik pada kalus kedelai.

EMS yang diharapkan dapat meningkatkan daya tahan kalus kedelai terhadap cekaman kekeringan dan aluminium ternyata tidak menghasilkan kalus yang toleran dalam jumlah yang signifikan setelah dilakukan percobaan. Hal ini mungkin disebabkan oleh sifat mutagenik EMS yang acak, di mana mutasi yang diinduksi bersifat tidak terprediksi dan ketidakstabilan sifat genetik pada generasi selanjutnya. Mutagen EMS menyebabkan perubahan pada basa DNA, terutama melalui alkilasi guanin, yang mengakibatkan guanin yang seharusnya berpasangan dengan sitosin menjadi berpasangan dengan timin. Proses alkilasi ini melibatkan penambahan gugus alkil, seperti gugus etil, pada atom hidrogen nomor 7 guanin dalam DNA, yang dapat mempengaruhi struktur dan fungsi gen (Khasanti et al., 2014).

Tabel 2. Persentase Jumlah Kalus yang Menghasilkan Embrio Somatik

Perlakuan	Mutasi	Non-Mutasi
0% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	0	0
5% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	0	0
10% PEG + 0 ppm $AlCl_3$	0	0
0% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	0	0
0% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	0	0
0% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	0	0
5% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	0	0
5% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	0	0
5% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	0	0
10% PEG + 50 ppm $AlCl_3$	0	0
10% PEG + 100 ppm $AlCl_3$	0	0
10% PEG + 150 ppm $AlCl_3$	0	1,67

Kalus yang diberi perlakuan EMS menyebabkan perkembangan kalus terhambat untuk beregenerasi menghasilkan embrio somatik. Hal ini sesuai dengan penelitian Purnamaningsih et al. (2014) menyatakan bahwa perendaman kalus dalam larutan EMS 0.5% selama 1, 2, dan 3 jam menurunkan regenerasinya membentuk struktur torpedo pada semua genotipe. Perlakuan EMS

menyebabkan kerusakan sel yang lebih besar dibandingkan dengan iradiasi sinar gamma, ditunjukkan dengan persentase pembentukan struktur torpedo setelah perlakuan EMS (0-15/eksplan) lebih kecil dibanding dengan iradiasi sinar gamma (10,3-26,3/eksplan).

Berdasarkan hasil uji coba, ditemukan bahwa kalus yang tidak mengalami induksi mutasi dapat menghasilkan embrio somatik

dalam kondisi kultur tertinggi yang terdiri dari 10% PEG + 150 ppm $AlCl_3$, walaupun dalam jumlah terbatas. Kalus yang bertahan hidup menunjukkan pembentukan struktur embrio somatik yang kemudian dapat berkembang menjadi benih somatik. Hal ini mengisyaratkan kemungkinan adanya variasi somaklonal yang terjadi selama proses seleksi ganda. Penggunaan ZPT auksin, khususnya 2,4-D, dalam media kultur in vitro, baik pada media seleksi PEG maupun $AlCl_3$ pada konsentrasi 10 ppm, diduga turut memperkuat kemungkinan terjadinya variasi somaklonal tersebut. Penelitian embriogenesis kedelai sebelumnya melaporkan bahwa penggunaan ZPT 2,4-D pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan variasi somaklonal (Saepudin, 2014). Di samping itu, seleksi in vitro ini juga dilakukan pada tahap kalus yang dapat memungkinkan terjadinya variasi somaklonal. Dari adanya pengaruh variasi somaklonal ini dapat memunculkan sifat toleransi baik terhadap cekaman tunggal kekeringan atau aluminium (tanah masam) maupun terhadap keduanya (cekaman ganda). Pada percobaan ini penggunaan konsentrasi PEG 10% dan $AlCl_3$ hingga 150 ppm didapatkan kalus embriogenik maupun embrio somatik tetap hidup (survive), diduga hal ini menunjukkan terdapatnya sifat toleransi (putatif) terhadap kekeringan dan atau tanah masam.

Hasil penelitian Baogui et al. (2010) menunjukkan bahwa pada genotipe tanaman toleran Al maka aktivitas enzim SOD akan meningkat sedangkan lipid peroksidase akan menurun baik pada tingkat kalus maupun akar. Oleh karena itu diduga bahwa mekanisme ketahanan Al pada tingkat kalus dan akar (tanaman) adalah sama.

Kalus yang telah diinduksi mutasi tidak berhasil menjadi mutan yang bertahan hidup dan menghasilkan embrio somatik yang diberikan perlakuan media cekaman kemungkinan disebabkan akibat adanya proses repair DNA. Dengan adanya mekanisme DNA repair sebagian besar perubahan spontan yang terjadi pada DNA

hanya bersifat sementara karena kerusakan tersebut segera diperbaiki oleh mekanisme DNA repair. EMS sebagai mutagen kimia memetilasi basa DNA terutama pada posisi O- dan N- yang menghasilkan kerusakan basa kecil seperti O6-metilguanin dan N7-metil adenin dan menginduksi ikatan silang antar untai yang menghasilkan 2 untai DNA yang berlawanan sehingga menghalangi proses replikasi dan transkripsi DNA. Mutasi yang terjadi pada genom tanaman setelah perlakuan metagenik tertentu ditentukan oleh spektrum lesi yang dihasilkan oleh mutagen dan efisiensi perbaikan DNA yang terlibat. Pemahaman tentang mekanisme DNA repair dan pengaturannya pada tanaman merupakan bagian terpenting dalam pemanfaatan teknologi mutasi secara efektif (Manova & Gruszka, 2015).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa induksi mutasi menggunakan etil metan sulfonat (EMS) tidak menghasilkan embrio somatik mutan kedelai yang toleran terhadap kekeringan dan cekaman aluminium. Sementara itu hasil kalus tanpa induksi mutasi menghasilkan embrio somatik yang diduga menjadi kandidat somaklon putatif toleran kekeringan dan aluminium setelah dilakukan seleksi ganda in vitro menggunakan agen seleksi PEG 4000 10 % dan $AlCl_3$ 150 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadi. (2013). Pemuliaan Mutasi Untuk Perbaikan Terhadap Umur Dan Produktivitas Pada Kedelai. *Jurnal Agrobiogen*. 9:135-142
- Baogui D, Hai N, Zhisheng Z, Cunyi Y. (2010). Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance. *Acta Physiol Plant*. 32(5):883-890.

- Badan Pusat Statistik (BPS). (2022). Impor Kedelai Menurut Negara Asal Utama. 2017-2021. BPS-RI. Jakarta
- Dalimunthe, S. R., Arif, A. B., & Jamal, I. B. (2015). Uji Ketahanan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Pioneer dan Srikandi secara in vitro. *Jurnal Pertanian Tropik*, 2(3), 292-299.
- Damayanti, F., Mariska, I., Suharsono, S., & Tjahjoleksono, A. (2017, July). Respon Kalus Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) pada Kondisi Tercekam Aluminium secara in vitro. In *Prosiding Industrial Research Workshop and National Seminar*, 8, 590-592.
- Husen, E., Fahmuddin A., & Dedi N. (2015). Sumberdaya Lahan Pertanian Indonesia. Luas Penyebaran, dan Potensi Ketersediaan. IAARD Press. Jakarta.
- Husni, A., Kosmiatin, M., & Mariska, I. (2006). Peningkatan toleransi kedelai Sindoro terhadap kekeringan melalui seleksi in vitro. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 34(1).
- Khasanti, H. K., Amurwanto, A., & Dwiputranto, U. (2014). Pengaruh Perendaman Etil Metan Sulfonat (EMS) Terhadap Daya Tahan Tanaman Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) Dc Polong Pendek dari Serangan Patogen *Rhizoctonia solani*. *Scripta Biologica*, 1(3), 203-207.
- Manova, V., & Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants—from models to crops. *Frontiers in plant science*, 6, 885.
- Nastiti, D. H. (2022). Induksi Embrio Somatik Sekunder Kedelai (*Glycine max* (L.) merrill) Varietas Dega dengan Pemberian Kombinasi 2,4-D dan NAA secara in vitro. [Skripsi], Universitas Andalas.
- Patade, V.Y., Bhargava, S., P. Suprasanna. (2012). Effects of NaCl and Iso-osmotic PEG Stress on Growth, Osmolytes Accumulation and Antioxidant Defense in Cultured Sugarcane Cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 108:279-286.
- Purnamaningsih, R., Mariska, I., Lestari, E. G., Hutami, S., & Yunita, R. (2014). Pengaruh Iradiasi Gamma dan Ethyl Methan Sulfonate Terhadap Pembentukan Embriosomatik Kedelai (*Glycine max* L.). *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 10(1).
- Rahayu, ES, & S. Sudarsono. (2015). In Vitro Selection Of Drought Tolerant Peanut Embryogenic Calli On Medium Containing Polyethylene Glycol And Regeneration Of Drought Tolerant Plants. *Emiratte Journal of Food and Agriculture*. 27(6): 475–487.
- Rasyad, A., & Fiarahman, B. (2022). Keragaan Kedelai (*Glycine max.*) Generasi M1 Hasil Mutasi Varietas Dega 1 Dengan Beberapa Konsentrasi Ethyl Methane Sulphonate. *Dinamika Pertanian*, 38(1), 1-10.
- Riniarsi, D. (2018). Outlook Kedelai Komoditas Pertanian Subsektor Tanaman Pangan. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian.
- Saepudin, A., Khumaida, N., Sopandie, D., & Ardie, S. W. (2014). Seleksi in vitro Embrio Somatik pada Beberapa Genotipe Kedelai untuk Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan dan Toksisitas Aluminium. [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sari, L., Purwito, A., Soepandi, D., Purnamaningsih, R., & Sudarmonowati, E. (2016). Induksi Mutasi dan Seleksi in vitro Tanaman Gandum (*Triticum aestivum* L.). *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 3(2), 48.
- Sinaga, E., MS. Rahayu, & A. Maharijaya. (2015). Seleksi Toleransi Kekeringan in vitro Terhadap Enam Belas Aksesori Tanaman Terung (*Solanum melongena* L.) dengan Polietilena Glikol (PEG). *Jurnal Hortikultura Indonesia*. 6 (4):20–28.

- Susanto, G.W.A & Nugrahaeni. (2017). Pengenalan & karakteristik varietas unggul kedelai. Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi. 12.
- Suhesti, S. (2015). Induksi Mutasi dan Seleksi in vitro Tebu (*Saccharum officinarum* L.) untuk Toleran Terhadap Kekeringan. [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sukmadjaja D, Purnamaningsih R, Priyatno TP. (2013). Seleksi in vitro dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning Untuk Ketahanan Terhadap Penyakit Layu Fusarium. *Jurnal Agrobiogen* 9:66-76
- Yuliasti, Y., & Sudarsono, S. (2011). Responses of Soybean Mutant Lines to Aluminium under in vitro and in vivo Condition. *Atom Indonesia*, 37(3), 126-132.