

## SELEKSI *IN VITRO* UNTUK TOLERANSI TERHADAP KEKERINGAN PADA JAGUNG (*Zea mays* L.) DENGAN POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)

Kaswan Badami dan Achmad Amzeri

### ABSTRACT

Genetic variation is a prerequisite for many breeding program that one of which can be generated through somaclonal variation. The objective of this research was to investigate effective media to induce embryo calli and to do in vitro calli regeneration for maize, and in vitro selection was conducted by growing embryogenic calli on medium containing polyethylene glycol (PEG). Plant material used in this study was 5 madura cultivars i.e elos, tambin, guluk-guluk, talango and manding. The results showed that (1) increasing addition 2,4-D on MS medium was significantly affected calli weight, however supplying 8 ppm 2,4-D was best for calli diameter, (2) The best medium to induce embryogenic calli formation was MS + 2 ppm 2,4-D + 3% manitol, (3) Increasing addition PEG on MS medium can return the mays ES growth, and (4) A tambin and guluk-guluk cultivars was tolerance cultivars whereas manding cultivar was drought sensitive cultivar.

*Key words* : *madura mays cultivars, in vitro culture, PEG*

### ABSTRAK

Keragaman genetik adalah syarat utama dalam berbagai program pemuliaan yang salah satunya dapat ditingkatkan melalui induksi varian somaklonal. Penelitian ini bertujuan untuk mencari induksi kalus embriogenik dan media regenerasi kalus in vitro yang efektif ada jagung dan seleksi toleransi terhadap kekeringan menggunakan PEG. Benih jagung yang digunakan adalah lima kultivar jagung madura (elos, tambin, guluk-guluk, talango dan manding). Hasil penelitian menunjukkan bahwa : (1) Peningkatan konsentrasi 2,4-D tidak berpengaruh nyata terhadap bobot kalus tetapi diameter kalus terbaik pada penambahan 8 ppm 2,4-D pada media MS, (2) Untuk merangsang terbentuknya kalus embriogenik, media yang

paling efektif adalah media MS + 2 ppm 2,4-D + manitol 3%, (3) Penambahan PEG dalam medium dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan ES jagung, dan (4) Kultivar tambin dan guluk-guluk merupakan kultivar yang lebih toleran terhadap medium PEG sedangkan tambin kurang toleran pada medium PEG.

*Kata kunci* : *kultivar jagung madura, kultur in vitro, PEG*

### PENDAHULUAN

Tanaman jagung merupakan komoditi yang sangat penting bagi masyarakat Madura, karena jagung merupakan makanan pokok penduduk Madura. Sehingga tanaman ini merupakan salah satu komoditi yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat Madura. Namun ironisnya, produksi perhektar tanaman ini paling rendah dibandingkan daerah penghasil jagung lainnya di Jawa Timur.

Rendahnya produksi jagung ditingkat petani tersebut disebabkan oleh kurang suburnya lahan, curah hujan yang cenderung rendah dan benih yang digunakan bukan hasil dari program pemuliaan (baik melalui seleksi atau hibridisasi). Cara memecahkan permasalahan tersebut adalah (1) Memperbaiki lingkungan tempat tanaman tersebut tumbuh dan berkembang, (2) Merakit suatu varietas yang tahan terhadap cekaman lingkungan biotik maupun abiotik dan mempunyai potensi hasil tinggi yang dihasilkan melalui program pemuliaan. Cara yang kedua adalah metode yang populer untuk mendapat mengatasi permasalahan di atas.

Adanya keragaman genetik pada tanaman hasil kultur jaringan (variasi somaklonal) memungkinkan untuk mendapatkan tanaman varian dengan karakteristik tertentu. Seleksi *in vitro* dengan menggunakan media selektif yang menggunakan PEG diharapkan dapat membantu mengidentifikasi varian somaklonal yang toleran kekeringan dan mengembangkan kultivar tanaman jagung yang toleran pada kondisi cekaman lingkungan.

Keberhasilan penggunaan teknik seleksi *in vitro* untuk mendapatkan tanaman kedelai yang toleran terhadap cekaman kekeringan memerlukan tersedianya (1) keragaman di tingkat sel/jaringan dalam kultur jagung, (2) metode seleksi *in vitro* untuk mengidentifikasi sel/jaringan yang toleran terhadap cekaman kekeringan, dan (3) metode regenerasi sel/jaringan yang toleran menjadi tanaman jagung secara *in vitro* yang efektif.

Untuk mendapatkan jagung yang mempunyai ketahanan terhadap cekaman kekeringan dengan menggunakan seleksi *in vitro* langkah pertama yang dilakukan adalah membentuk embrio somatik (ES) secara *in vitro* dari sejumlah genotipe jagung sehingga diperoleh media induksi ES yang efektif. Selanjutnya digunakan yang mengandung PEG sebagai media selektif dalam seleksi *in vitro* untuk mengidentifikasi varian somaklonal yang toleran terhadap kekeringan. Kemudian tanaman hasil seleksi *in vitro* dalam media selektif dengan PEG diregenerasikan dan dievaluasi keragaman sifat morfologis dan agonomisnya, serta tanaman varian somaklonal tersebut dievaluasi responnya terhadap cekaman kekeringan untuk mengidentifikasi varian somaklonal dengan sifat toleran terhadap cekaman kekeringan. Pada akhirnya, karakter fisiologis varian somaklonal yang toleran kekeringan tersebut dievaluasi untuk mengetahui mekanisme toleransinya terhadap cekaman kekeringan.

#### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret sampai November 2009. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 varietas jagung lokal madura yaitu : Elos, Tambin, Guluk-guluk, Talango dan Manding.

##### ***Induksi kalus dari embrio muda***

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktorial dua faktor dengan 10 ulangan dimana faktor pertama adalah kultivar dan faktor kedua adalah media kultur. Faktor pertama adalah kultivar jagung yang terdiri atas lima kultivar dan faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dengan media MS yang terdiri atas 5 taraf yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Sebagai unit percobaan adalah 1 kalus tiap botol yang diamati selama 3 minggu.

Media yang digunakan adalah media MS setengah padat dan mengandung zat pengatur tumbuh 2,4-D (sesuai perlakuan). Sumber eksplan berupa embrio muda (immature embryo) dengan ukuran antara 1.0-1.5 mm diambil dari biji jagung yang ditanam di lapang lebih kurang 16 sampai 2 hari setelah perlakuan penyerbukan sendiri. Embrio yang sudah diambil langsung diinkubasikan dalam botol kultur sesuai perlakuan. Dalam setiap botol kultur ditanam sebanyak 4 buah eksplan. Inkubasi dilakukan selama 1 minggu kemudian skutelum yang tumbuh di ujung kalus dipotong dan dibuang. Selanjutnya kalus dikulturkan kembali pada media yang sama selama 2 minggu. Variabel yang diamati meliputi bobot kalus dan diameter kalus. Analisis data dilakukan dengan analisis varians (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) taraf 5 %.

##### ***Induksi ES Sekunder dari ES Primer***

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktorial dua faktor dengan 10 ulangan dimana faktor pertama adalah genotipe dan faktor kedua adalah media kultur. Faktor pertama adalah kultivar jagung yang terdiri atas 5 kultivar dan faktor kedua adalah media induksi kalus embriogenik yang terdiri atas dua jenis media yaitu media 1 (media dasar + 2 ppm 2,4-D), dan media 2 (media dasar + 2 ppm 2,4-D + manitol 3 %). Sebagai unit percobaan adalah 1 kalus tiap botol yang diamati selama 1 minggu.

Pada tahap ini embrio yang sudah diambil langsung diinkubasikan di dalam botol kultur dengan media dasar 2 ppm 2,4-D selama satu minggu. Selanjutnya dilakukan sub kultur pada media induksi kalus embriogenik sesuai perlakuan selama 4 minggu. Pada akhir percobaan diamati bobot, diameter kalus dan persentase kalus embriogenik serta pengamatan visual terhadap kualitas kalus. Analisis data dilakukan dengan analisis varians (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) taraf 5 %.

ES yang terbentuk setelah 4 minggu dalam medium induksi ES sekunder dipindahkan ke media maturasi yang terdiri atas media MS dengan penambahan sukrosa 30 g/l dan arang aktif 1 g/l selama 1 bulan agar terjadi perkembangan ES

sekunder yang sempurna yaitu ES sekunder. Dari kumpulan ES yang berkembang dipilih 20 – 30 ES dengan ukuran 3 – 5 mm dan dikecambahkan dalam media perkecambahan yang tersusun dari garam makro dan setengah konsentrasi garam makro dan setengah konsentrasi garam mikro penyusun media MS, Vitamin B5, sukrosa 30 g/l, dan dengan penambahan kombinasi 0,5 ppm BAP dan 0,1 ppm NAA. Medium perkecambahan yang terbaik ditentukan berdasarkan frekuensi terbentuknya akar primer dan munculnya daun primer dari ES yang bertahan hidup dalam proses perkecambahan.

Medium perkecambahan yang optimum dari percobaan di atas kemudian digunakan untuk mengevaluasi respon perkecambahan ES dari lima kultivar jagung. ES sekunder umur satu bulan dari lima kultivar jagung yang diuji dikulturkan dalam media maturasi. Selanjutnya 20 – 30 ES yang telah berkembang sempurna dikulturkan dalam media perkecambahan terpilih. Efektivitas perkecambahan ditentukan berdasarkan frekuensi terbentuknya akar primer dan munculnya daun primer dari ES yang bertahan hidup dalam proses perkecambahan. Perkecambahan ES dilakukan dalam ruang kultur yang diberi penyinaran selama 24 jam dengan intensitas penyinaran 1000-1500 lux, menggunakan dua lampu TL 40 watt.

Embrio somatik yang telah berkecambah selanjutnya dipindahkan ke media MS dengan penambahan arang aktif 1 g/l agar berkembang menjadi plantlet. Plantlet yang didapat dipindahkan ke larutan aquosa yang mengandung IBA 1 mg/l sehingga membentuk perakaran baru. Setelah sistem perakaran baru terbentuk, plantlet dipindahkan ke media tanah setelah melalui tahapan aklimatisasi dalam lingkungan dengan kelembaban tinggi.

#### ***Seleksi in vitro dalam Media Mengandung PEG***

Untuk mengevaluasi pengaruh PEG terhadap pembentukan ES jagung, ES jagung dari kelima genotipe jagung yang diuji yang berumur satu bulan ditanam dalam media cair selektif yang terdiri atas garam makro dan mikro penyusun media MS, vitamin B5, kombinasi NAA 10 mg/l dan 2,4-D 10 mg/l, sukrosa 15 g/l, dengan penambahan berbagai konsentrasi PEG (BM 6000). Konsentrasi PEG yang digunakan terdiri atas 5, 10, 15, 20% yang setara dengan tekanan osmotik -0.03

(untuk PEG 5%), -0.19 (PEG 10%), -0.41 (PEG 15%) dan -0.67 Mpa (PEG 20%) (Mexal et al., 1975). Penambahan PEG dalam media, menyebabkan media akan menjadi cair (medium cair), sehingga untuk mencegah agar kalus tidak tenggelam dalam media tersebut, digunakan busa sintetik yang dilapisi dengan kertas saring. Kalus yang telah dipindahkan ke dalam medium, disimpan dalam ruang kultur (ruang inkubasi) dengan temperatur suhu 26<sup>0</sup>C. Setelah kultur berumur 4 minggu kalus embriogenik yang tahan selanjutnya dproliferasi kembali dalam media yang sama.

Setiap 4 minggu sekali dilakukan pemindahan eksplan pada media yang baru (segar) atau disubkulturkan dengan menggunakan media yang sama untuk masing-masing perlakuan. Subkultur dilakukan sebanyak 3 kali. Peubah yang diamati meliputi kulaitas, presentase kalus mati, diameter kalus, volume kalus, bobot segar dan kering kalus, presentase kalus yang bergenerasi, jumlah tunas dan pertumbuhan plantlet. Kulaitas kalus dinyatakan dalam indeks kulaitas kalus, yaitu skor nilai perubahan warna kalus (kalus warna putih bening/putih kehijauan = nilai 5, putih kekuningan = nilai 4, kuning kecoklatan = nilai 3, coklat = nilai 2, hitam = nilai 1 dan mati = 0).

#### ***Regenerasi Varian Somaklonal Hasil Seleksi In vitro***

ES yang terbentuk dalam media selektif dengan penambahan PEG dipindahkan ke media maturasi sehingga membentuk ES yang sempurna. Selanjutnya ES yang didapat dikecambahkan dalam media perkecambahan ES dan diregenerasikan menjadi plantlet. Kultur diinkubasi dalam ruang kultur bersuhu 25<sup>0</sup>C dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam. Perkembangan ES dan jumlah plantlet yang didapat diamati selama periode inkubasi.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### ***Induksi ES Primer dari Embrio Muda***

Dari hasil induksi ES primer dari embrio muda, terdapat perbedaan respon bobot dan diameter kalus pada setiap kultivar terhadap penambahan konsentrasi 2,4-D. Pada kultivar elos, tambin, talango dan manding penambahan konsentrasi 2,4-D tidak berpengaruh terhadap bobot

kalus. Pada kultivar Guluk-guluk, bobot kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi 6 ppm (Tabel 1).

Pada kultivar tambin penambahan 2,4-D pada konsentrasi 10 ppm berpengaruh terhadap diameter kalus tetapi tidak berbeda nyata dengan penambahan 2,4-D pada konsentrasi 8 ppm. Pada kultivar elos, guluk-guluk dan talango penambahan 2,4-D tidak berpengaruh nyata terhadap diameter kalus pada setiap konsentrasi yang ditambahkan. Sedangkan pada kultivar manding penambahan 2,4-D pada konsentrasi 10 ppm, diameter kalus yang dihasilkan berbeda nyata terhadap perlakuan yang lain.

Menurut Ranch *et al* (1986) bahwa 2,4-D merupakan auksin terbaik untuk menginduksi pembentukan ES dari eksplan dibandingkan dengan tipe auksin lain (IAA, IBA dan NAA). Sifat 2,4-D yang mudah diserap sel tanaman, tidak mudah terurai dan menjadi tidak aktif, berfungsi sebagai auksin kuat dan mampu mendorong aktifitas morfogenetik yang merupakan beberapa factor pendukung, sehingga 2,4-D lebih baik dari tipe auksin lain. Selanjutnya menurut Barwale *et al* (1986), penambahan 2,4-D pada konsentrasi 5-10 ppm dalam medium induksi ES mampu menginduksi pembentukan ES dengan frekuensi yang tinggi.

**Tabel 1. Pengaruh Interaksi Konsentrasi 2,4-D dalam Media dan Kultivar Jagung terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman jagung pada 3 MSK**

Kultivar	2,4-D (ppm)	Bobot Kalus (g)	Diameter Kalus (mm)
Elos	2	0.08 abc	0.68 efghijk
	4	0.03 a	0.54 defg
	6	0.04 a	0.54 defg
	8	0.06 ab	0.73 fghijkl
	10	0.05 a	0.78 ijklm
Tambin	2	0.08 abc	0.62 efghi
	4	0.12 abc	0.85 ijklm
	6	0.10 abc	0.80 ijklm
	8	0.15 abcd	0.92 klmn
	10	0.21 cde	1.00 n
Guluk-guluk	2	0.09 abc	0.88 ijklm
	4	0.12 abc	0.78 hijklm
	6	0.39 f	0.81 ijklm
	8	0.27 e	0.82 ijklm
	10	0.11 abc	0.85 ijklm
Talango	2	0.10 abc	0.88 ijklm
	4	0.19 bcde	0.88 ijklm
	6	0.11 abc	0.81 ijklm
	8	0.11 abc	0.86 ijklm
	10	0.12 abc	0.92 klmn
Manding	2	0.08 abc	0.45 bcde
	4	0.04 a	0.30 ab
	6	0.04 a	0.35 ab
	8	0.06 ab	0.26 a
	10	0.05 a	0.92 klmn

**Keterangan :** Angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DNMRT pada taraf 5%.



**Gambar 1.** Perkembangan Pembentukan Embrio Somatik (ES), Pembentukan Plantlet dan Penanaman Tanaman Hasil Kultur Jaringan di Media Tanah. A. ES primer yang diinduksi dari embrio muda, B. ES sekunder yang diinduksi dari ES primer, C. Plantlet, D. Tanaman jagung hasil kultur jaringan dalam media kultur

#### *Induksi ES Sekunder dari ES Primer*

Pengamatan induksi kalus embriogenik dilakukan pada 4 minggu setelah sub kultur. Kalus embriogenik adalah kalus yang telah mengalami embryogenesis somatic seperti ditunjukkan pada Gambar 1B. Semua kultivar yang diuji cukup tanggap terhadap media kultur yang dicobakan. Semua kultivar dapat diinduksi embriogenik, walaupun dengan frekuensi yang berbeda-beda. Jumlah kalus embriogenik nyata lebih tinggi pada media MS + 2ppm 2,4-D + 3% manitol. Dalam hal ini kultivar tambin dan guluk-guluk mempunyai frekuensi tertinggi (100 %), selanjutnya manding (70 %), dan yang terendah adalah kultivar elos dan talango (60 %). Hal ini berarti bahwa kultivar tambin dan guluk-guluk relatif lebih baik tanggapnya daripada kultivar lain untuk komposisi media yang dicobakan (Tabel 2).

Penambahan manitol 3% pada media induksi kalus embriogenik meningkatkan diameter kalus walaupun bobot kalus tidak beda nyata dibandingkan media tanpa manitol. Penambahan media MS dengan 2,4-D dan manitol 3% memberikan pengaruh yang relatif baik. Sutjahjo (1994) menyatakan bahwa dengan konsentrasi 2,4-D sebanyak 2 ppm selama masa inkubasi 4 minggu dapat menghasilkan frekuensi kalus embriogenik dan bobot basah kalus serta jumlah plantlet tertinggi. Pemanjangan fase kalus sampai 8 minggu menyebabkan pertumbuhan kalus lebih terdorong untuk membentuk akar daripada membentuk tunas, sehingga pada akhirnya gagal membentuk plantlet. Diduga manitol merupakan gula alkohol yang berperan di dalam memperbaiki tekanan osmosis media sehingga sel-sel menjadi lebih aktif membelah dalam membentuk kalus embriogenik.

**Tabel 2.** Pengaruh Kultivar terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Jagung pada Media MS yang diberi Manitol

Kultivar	Media	Bobot Kalus (g)	Diameter Kalus (mm)	Persen Kalus Embriogenik
Elos	1	0.083 a	0.65 a	30
	2	0.142 abc	0.84 abcde	60
Tambin	1	0.347 d	1.05 cdef	40
	2	0.230 abcd	1.10 def	100
Guluk-guluk	1	0.207 abcd	0.70 ab	30
	2	0.250 abcd	1.70 g	100
Talango	1	0.224 abcd	0.88 bcde	50
	2	0.226 abcd	1.10 def	60
Tambin	1	0.262abcd	0.79 abc	20
	2	0.140 ab	1.23 f	70

**Keterangan :** 1 = media MS + 2 ppm 2,4-D; 2 = media MS + 2 ppm 2,4-D + 3% manitol; angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DNMR pada taraf 5%.

#### *Perkecambahan ES dan Pembentukan Plantlet*

ES sekunder yang terbentuk dalam medium induksi seringkali belum sempurna perkembangannya sehingga perlu dikulturkan dalam medium maturasi. Eksplan yang sudah berhasil diinduksi membentuk kalus embrionik selanjutnya diinduksi lagi untuk memebentuk tunas dan akar sehingga menjadi plantlet, yaitu tanaman mini dalam botol kultur (Gambar 1C). Pada tanaman jagung umumnya tunas dan akar dapat diinduksi dengan cara memindahkan kalus embriogenik yang sudah terbentuk pada media inisiasi ke dalam media regenerasi tanpa hormon (Close and Ludeman, 1987). Hal ini menunjukkan bahwa di dalam kalus embriogenik jagung tersebut sudah cukup tersedia ZPT *endogen* dengan proporsi sitokinin dan auksin seimbang sehingga mampu mendorong terbentuknya tunas dan akar. Namun penambahan ZPT 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm NAA ditambah dengan casein hidrolisat dan manitol ternyata mampu meningkatkan frekuensi pembentukan

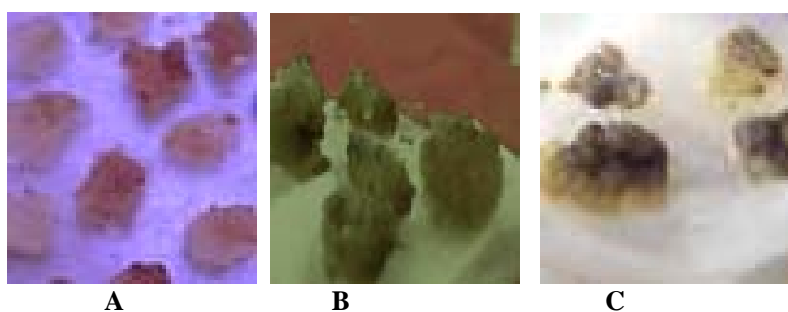
tunas dan plantlet (Sutjahjo, 1994). Komposisi ZPT pada media tersebut merupakan komposisi media terbaik untuk menginduksi tunas dan akar secara seimbang sehingga dapat dihasilkan plantlet yang cukup banyak.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa media perkecambahan dengan penambahan kombinasi 0,5 ppm BAP dan 0,1 ppm NAA mampu mengecambahkan ES sekunder dari kelima kultivar jagung yang diuji. Frekuensi keberhasilan perkecambahan ES sekunder yang didapat berkisar 60 sampai 80%, di mana prosentase perkecambahan tertinggi terdapat pada kultivar guluk-guluk sedangkan terendah pada kultivar elos dan manding. Selanjutnya embrio somatic yang berkecambah dipindahkan ke dalam media MS dengan penambahan arang aktif 1g/l. Pada media ini kecambah yang ditanam berkembang menjadi plantlet, yang ditandai dengan terbentuknya akar dan daun baru.

**Tabel 3. Perkembangan ES Lima Kultivar Madura dalam Media Perkecambahan dengan Penambahan Kombinasi 0,5 ppm BAP dan 0,1 ppm NAA.**

Kultivar	ES yang dikecambahkan	ES yang berkecambah	Prosentase ES berkecambah (%)
Elos	15	9 a	60 a
Tambin	15	11 a	73 ab
Guluk-guluk	15	12 a	80 b
Talango	15	10 a	67 a
Manding	15	9 a	60 a

**Keterangan** : angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DNMRT pada taraf 5%.



**Gambar 2. Pengaruh PEG terhadap Kualitas dan Pertumbuhan Kalus. (A) Perubahan warna kalus pada metode langsung, (B) Kalus ada media PEG 5% (c) Kalus yang bertahan hidup pada media PEG 20%, dan yang warna hitam (mati)**

**Pengaruh PEG terhadap Pembentukan ES Jagung**

Perlakuan media selektif dengan PEG secara umum menghambat pertumbuhan dan perkembangan ES sekunder yang ditanam. Representasi pengaruh penghambatan PEG terhadap pertumbuhan dan perkembangan ES jagung dapat dilihat pada Gambar 2. Meningkatnya konsentrasi PEG dalam media selektif juga meningkatkan penghambatan perkembangan ES sekunder yang diamati (Tabel 5). Pada perlakuan control (PEG 0%), frekuensi eksplan yang membentuk ES berkisar 97 – 99%, sedangkan jumlah ES yang terbentuk berkisar antara 15,2 – 18,1 ES/eksplan.

Sebagian besar eksplan mengalami kematian ketika ditanam dalam media selektif dengan konsentrasi PEG 15% atau 20%. Frekuensi eksplan yang mati dalam media selektif dengan

PEG 20% antara 45 – 59% sedangkan PEG 15% eksplan yang mati berkisar antara 7 – 15%. Selain mengalami kematian, rata-rata jumlah ES yang terbentuk per eksplan juga mengalami penurunan. Jumlah rata-rata ES yang terbentuk pada media selektif PEG 20% hanya berkisar antara 0,9 – 3,5 ES per/eksplan sedangkan untuk perlakuan PEG 15% hanya berkisar antara 3,4 – 7,4 ES/eksplan. Potensial osmotik media tumbuh merupakan faktor penting yang berpengaruh terhadap proses pembentukan ES dalam kultur *in vitro*. Penurunan potensial air media akibat penambahan PEG diduga merupakan penyebab pengaruh negative PEG terhadap pembentukan ES dari eksplan jagung. Menurut Kong *et al* (1998) bahwa PEG dalam media dapat menurunkan proliferasi dan pertumbuhan jaringan eksplan dan regenerasi tunas.

**Tabel 4. Respon Pertumbuhan dan Perkembangan ES dari Lima Kultivar Jagung dalam Media Selektif dengan Penambahan berbagai Konsentrasi PEG**

Kultivar	Konsentrasi PEG (%)	% Eksplan Hidup	Jumlah ES per Eksplan	% Kematian & Penurunan Jml. ES/eksplan
Elos	0	97 c	15,2 d	1 (0)
	5	96 c	10,1 c	4 (33)
	10	94 c	7,6 b	6 (50)
	15	90 c	3,5 b	10 (77)
	20	46 a	1,2 a	54 (92)
Tambin	0	99 c	16,6 d	1 (0)
	5	98 c	14,0 c	2 (16)
	10	97 c	8,5 c	3 (52)
	15	92 c	5,5 b	8 (67)
	20	50 b	2,2 a	50 (87)
Guluk-guluk	0	99 c	18,1 d	1 (0)
	5	99 c	16,0 d	1 (12)
	10	98 c	10,1 c	2 (44)
	15	93 c	7,4 b	7 (59)
	20	55 b	3,5 b	45 (81)
Talango	0	98 c	15,5 d	1 (0)
	5	97 c	12,5 c	3 (19)
	10	95 c	7,8 b	5 (50)
	15	89 c	4,6 b	11 (70)
	20	41 a	1,5 a	59 (90)
Manding	0	97 c	15,2 d	3 (0)
	5	96 c	12,0 c	4 (20)
	10	94 c	8,0 c	6 (47)
	15	85 bc	3,4 b	15 (78)
	20	39 a	0,8 a	61 (95)

**Keterangan :** angka dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DNMRT pada taraf 5%.

Frekuensi eksplan yang membentuk ES pada media selektif dengan konsentrasi PEG 5% atau 10% tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (PEG 0%). Pada perlakuan PEG 5%, penurunan frekuensi eksplan yang membentuk ES berkisar antara 1 – 4% sedangkan pada perlakuan PEG 10% berkisar antara 2 – 6%. Namun demikian, jumlah ES yang terbentuk per eksplan cenderung menurun pada medium selektif dengan konsentrasi PEG 5%. Pada perlakuan PEG 5%, rata-rata ES yang terbentuk berkisar antara 10,1 – 16,0 ES/eksplan. Sedangkan untuk perlakuan PEG 10%, rata-rata ES yang terbentuk berkisar antara 7,6 – 10,1 ES/eksplan.

Kemampuan PEG untuk menurunkan potensial air diharapkan dapat berfungsi sebagai kondisi selektif untuk menduga respon jaringan yang ditanam terhadap stress kekeringan dan mengisolasi sel/jaringan varian yang mempunyai fenotipe stress toleran. Efektifitas PEG untuk menduga respon tanaman jagung terhadap stress kekeringan secara *in vitro* telah diuji dengan mengevaluasi kemampuan membentuk ES kelima kultivar jagung yang toleran dan peka terhadap stress kekeringan. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kultivar jagung yang toleran stress kekeringan mampu berkembang dan membentuk ES dalam media selektif dengan konsentrasi PEG lebih tinggi dibandingkan kultivar peka. Adanya kesesuaian antara hasil evaluasi secara *in vitro* dengan penapisan di lapang mengindikasikan media dengan penambahan PEG dapat digunakan sebagai media selektif untuk melakukan seleksi *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultivar tambin dan guluk-guluk merupakan kultivar yang toleran terhadap kekeringan, hal ini ditunjukkan dari frekuensi pembentukan ES masing-masing 92% dan 93% pada media PEG 15%. Pada perlakuan PEG 20%, frekuensi pembentukan ES pada kultivar tambin 50% dan kultivar guluk-guluk 55%. Kultivar manding merupakan tanaman yang agak peka terhadap cekaman kekeringan. Frekuensi pembentukan ES dari eksplan kultivar manding masih relative tinggi pada perlakuan PEG sampai 15% yaitu berkisar antara 85-97%. Pada perlakuan PEG 20%, frekuensi pembentukan ES dari eksplan mencapai 39%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelima kultivar jagung yang diuji mempunyai konsentrasi PEG sub-lethal yang berbeda. Konsentrasi sub-lethal

didefinisikan sebagai perlakuan PEG yang menurunkan eksplan yang hidup atau jumlah ES/eksplan minimal sebesar 95% dibandingkan perlakuan kontrol (0% PEG). Berdasarkan definisi tersebut, konsentrasi sub-lethal untuk kultivar elos, tambin, guluk-guluk dan talango belum tercapai dengan perlakuan PEG 20%. Sedangkan kultivar manding konsentrasi sub-lethal telah dicapai pada perlakuan PEG 20%. Perlakuan PEG 20% selanjutnya dipilih sebagai konsentrasi sub-lethal dan ditambahkan dalam media selektif untuk percobaan seleksi *in vitro*.

Naabors dan Dykes (1985), menyatakan dalam seleksi *in vitro* harus digunakan media selektif dengan tekanan seleksi sub-lethal, yaitu tekanan seleksi yang menghambat pertumbuhan jaringan hingga minimal 95%. Penggunaan konsentrasi sub-lethal diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan seleksi *in vitro* dan menurunkan kemungkinan terjadinya escaped. Dalam penelitian ini konsentrasi PEG sub-lethal untuk menghambat pembentukan ES dari eksplan jagung adalah 20%. Perlakuan PEG sub-lethal (20%) terbukti mampu mematikan atau paling tidak menghambat perkembangan eksplan yang ditanam. Seleksi langsung pada konsentrasi PEG sub-lethal menghasilkan prosentase eksplan hidup yang rendah dari sub-kultur I sampai dengan sub kultur III (Tabel 5). Sub kultur eksplan ke media selektif yang masih segar dilakukan setiap bulan sehingga dalam seleksi langsung, eksplan ES diaparkan dengan kondisi sub-lethal selama 3 bulan. Persentase eksplan yang masih hidup tertinggi pada kultivar tambin dan guluk-guluk, yaitu berkisar antara 61% pada sub-kultur III sedangkan pada kultivar manding hanya 33% eksplan yang masih hidup pada sub-kultur III. Untuk kelima kultivar yang diseleksi secara langsung, presentase eksplan ES yang hidup menurun dari sub-kultur I ke sub-kultur II, dan meningkat dari sub-kultur II ke sub-kultur III. Dalam seleksi langsung ini rata-rata jumlah ES per eksplan yang masih hidup pada sub-kultur I, II dan III pada kultivar tambin dan guluk-guluk mempunyai jumlah ES yang hidup lebih banyak dibanding kultivar lainnya sedangkan kultivar manding mempunyai jumlah ES/eksplan yang hidup aling sedikit. Seleksi secara bertahap pada konsentrasi 10%, 15% dan 20% PEG masing-masing selama satu bulan, menghasilkan persentase eksplan yang hidup lebih tinggi dibandingkan dengan seleksi langsung.



**Tabel 5. Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Embrio Somatik dari Kelima Kultivar Jagung yang Ditanam dalam Media Selektif dengan Kosentrasi PEG sub-letal Secara Langsung atau Secara Bertahap.**

Kultivar	Metode Seleksi	% Eksplan yang hidup			Jumlah embrio/eksplan			Total ES pada akhir seleksi
		Sub-1	Sub-2	Sub-3	Sub-1	Sub-2	Sub-3	
Elos	Bertahap	93	94	50	7.2	6.5	2.0	1010
	Langsung	50	32	47	1.9	1.8	1.6	50
Tambin	Bertahap	86	95	64	7.7	6.9	2.0	1372
	Langsung	59	43	61	3.6	1.8	1.8	76
Guluk-guluk	Bertahap	94	97	53	7.3	6.2	2.4	2020
	Langsung	48	38	61	2.1	1.9	1.7	68
Talango	Bertahap	93	95	51	7.1	6.6	2.1	1002
	Langsung	49	31	45	2.0	1.8	1.6	48
Manding	Bertahap	94	71	26	5.4	3.3	1.4	306
	Langsung	43	16	33	1.8	1.4	0.9	4

Pada seleksi langsung atau bertahap, total ES hasil seleksi yang didapat dari kultivar toleran (tambin dan elos) lebih banyak dibandingkan dari kultivar agak peka (manding). Hal tersebut diduga karena sel atau jaringan dari kultivar toleran lebih mampu beradaptasi terhadap kondisi stress PEG dibandingkan kultivar peka.

Seleksi *in vitro* secara bertahap menghasilkan jumlah ES hasil seleksi lebih banyak dibandingkan seleksi langsung pada EG sub-letal (20%). Hal ini diduga karena dua mekanisme, yaitu : (1) daya adaptasi sel/jaringan terhadap media selektif atau (2) pengayaan (enrichment) sel atau jaringan varian yang toleran selama tahapan seleksi. Sel atau jaringan yang ditanam dalam kondisi tekanan seleksi yang meningkat secara bertahap kemungkinan dapat beradaptasi terhadap kondisi stres tanpa mengalami perubahan genetik (mutasi). Dalam penelitian ini, sebagian besar ES hasil seleksi bertahap diduga berkembang dari sel/jaringan yang mampu beradaptasi terhadap stres PEG dan bukan dari sel/jaringan varian somaklonal yang toleran. Jika hal tersebut benar maka sebagian besar ES hasil seleksi bertahap merupakan ES yang escaped dari proses seleksi dan akan menghasilkan tanaman yang sama responnya terhadap stres kekeringan seperti tanaman asal.

Kondisi selektif akibat penambahan PEG dalam media bersifat menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel/jaringan yang peka. Dengan seleksi secara bertahap, sel/jaringan varian yang toleran dapat berkembang normal sedangkan yang peka secara bertahap mengalami kematian. Melalui seleksi bertahap diharapkan

terjadi proliferasi atau perbanyakkan klonal sel/jaringan varian yang toleran sebelum diseleksi pada kosentrasi PEG sub-letal sehingga pada akhir periode seleksi akan diperoleh ES hasil seleksi dalam jumlah yang lebih banyak. Jika mekanisme ini yang terjadi maka sebagian besar ES hasil seleksi merupakan ES yang berkembang dari sel/jaringan varian somaklonal dan akan menghasilkan tanaman yang toleran stres kekeringan.

## KESIMPULAN

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Peningkatan kosentrasi 2,4-D tidak berpengaruh nyata terhadap bobot kalus tetapi diameter kalus terbaik pada penambahan 8 ppm 2,4-D pada media MS.
2. Untuk merangsang terbentuknya kalus embriogenik, media yang paling efektif adalah media MS + 2 ppm 2,4-D + manitol 3%.
3. Penambahan PEG dalam medium dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan ES jagung.
4. Kultivar tambin dan guluk-guluk merupakan kultivar yang lebih toleran terhadap medium PEG sedangkan tambin kurang toleran pada medium PEG.

### Saran

Perlu dilakukan uji karakter agronomis dan morfologis pada kultivar jagung hasil seleksi *in vitro* serta identifikasi varian somaklonal toleran kekeringan pada populasi jagung hasil seleksi *in*

*in vitro* dengan PEG untuk mendapatkan tanaman jagung yang toleran terhadap kekeringan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM., 1986. Plant Regeneration from Callus Cultures of Several Soybean Genotype via Embryogenesis and Organogenesis. *Lanta* 167:437-481
- Close, K.R. and L.A. Ludeman, 1987. The Effect of Auxin-like Plant Growth Regulator and Osmotic Regulation on Induction of Somatic Embryogenesis from Elite Maize Inbred. *Plant Sci.* 52:81-89.
- Kong L, Attree SM, Fowkw LC., 1998. Effects of Polyethylene Glycol and Methylglyoxal bis (guanyhydrzone) on Endogenous Polyamine Levels and Somatic Embrio Maturation in White Spruce (*Picea glauca*). *Plant Sci* 133 : 211 – 220.
- Nabors MW, Dykes TA., 1985. Tissue Culture of Cereal Cultivar with Increased Salt, Drought, and Acid Tolerance. *Biotechnology in International Agricultural Research*. Di dalam : *Proceedings of The Inter-center Seminar on International Agricultural Research Center and Biotechnology*. April 1984.
- Ranch JP, Oglesby L, Zielenski AC., 1986. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Soybean by Somatic Embriogenesis. Di dalam : Vasil IK (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press. New York. Hal : 97 – 110.
- Sutjahjo, S.H, 1994. Induksi Keragaman Somaklonal ke Arah ketenggangan terhadap Keracunan Aluunium pada Tanaman Jagung. Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.