

**SELEKSI SEL KELEDAI (GLYCINE MAX. MERR. KULTIVAR CIKURAY)  
YANG TOLERAN TERHADAP NACL PADA KULTUR SUSPENSI YANG  
MENGANDUNG VITAMIN B51**

**Tia SETIAWATI, Salamah SANOESI dan Danny Septana WAHIDI**

Jurusan Biologi FMIPA — Universitas Padjadjaran

Jatinangor Km 21, Surnedang 45363

Tel/Faks (022) 7796412. Email : [biologiunpad@bdg.centrin.id](mailto:biologiunpad@bdg.centrin.id)

**ABSTRACT**

The research about cell selection of Cikuray soybean (*Glycine max* (L) Merr) which tolerant to NaCl in suspension culture contained B51 vitamine was carried out. The experiment use experimental method, factorial completely randomized design with two factors. They were NaCl concentrations (0,00%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,00%; 1,25% and 1,50%), and vitamine (B5 vitamine as controle, and B51 vitamine). Friable callus used to make suspension culture obtained by planting hipocotile of soybean seedling on B5 solid medium with addition of 3,5 mg/ L 2,4-D. The result showed that addition of NaCl on B5 liquid medium contained B51 vitamine influenced cells growth. The soybean cells still tolerant to 1,50% concentration of NaCl. There were interaction between the addition of B51 vitamine with 1,25% concentration of NaCl at 3rd day, with 1,00% concentration of NaCl at 6th day with 1,50% concentration of NaCl at 9th day to cells number. Also with 0,50% concentration of NaCl to cells viability at 9th day, and with 1,00% concentration of NaCl to dry weight of cells at 9th day.

Key Word : *Glycine max*, Suspension Culture, NaCl, Vitamine B5, Vitamine B51 .

**PENDAHULUAN**

Keledai merupakan sumber pangan yang produksinya di Indonesia masih relatif rendah dan baru dapat memenuhi sekitar 10% kebutuhan dalam negeri sehingga masih harus diimpor (Hutami dkk., 2001). Lahan yang paling sesuai untuk pertumbuhan keledai seperti di pulau Jawa telah berubah fungsi dari lahan pertanian menjadi lahan non pertanian seperti untuk industri dan perumahan. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan adalah dengan ekstensifikasi ke kawasan kurang produktif pesisir/pantai di luar pulau Jawa. Masalah utama yang dihadapi di daerah pesisir/pantai adalah tingginya kadar garam/salinitas terutama NaCl yang dalam tingkat dan kondisi tertentu menghambat pertumbuhan tanaman budidaya, termasuk kedelai (Naicla, 1995).

Beberapa penelitian untuk mengatasi masalah salinitas telah dilakukan secara *in vivo* dengan pelem-baban benih keledai pada larutan NaCl untuk meningkatkan kemampuan adaptasi tanaman tersebut pada tanah salin (Suharsi dkk, 1991) atau dengan penyeleksian kultivar kedelai yang tahan garam (Harnowo, 2000). Sedangkan secara *in vitro* melalui kultur jaringan adalah dengan melakukan seleksi sel dari kultur suspensi. Rath (1998) telah berhasil menyeleksi sel kedelai yang tahan aluminium. Seleksi sel yang toleran terhadap stress garam telah berhasil pula dilakukan pada tanaman tebu (*Saccharum* sp.) (Soeryowinoto, 1996). Kedelai kultivar Cikuray dikenal dengan kedelai hitam, merupakan salah satu kultivar unggul yang relatif tahan salinitas (Harwono, 2000). Untuk mendapatkan sel kedelai tahan garam

secara in vitro sering digunakan kultur suspensi sel yaitu kultur sel-sel bebas dalam medium cair. Kultur suspensi sel diperoleh dengan menggunakan kalus meremah sebagai inokulan. Medium yang digunakan untuk kultur suspensi sel kedelai adalah medium B5 dengan penam-bahan vitamin B5 atau B51 sebagai katalis berbagai proses metabolisme sel (Narayanaswamy, 1994). Untuk seleksi sel yang tahan garam, ke dalam medium ditambahkan NaCl dalam berbagai konsentrasi sehingga diperoleh konsentrasi NaCl tertinggi dimana sel masih dapat hidup.

#### **Bahan dan Metode**

Bahan Penelitian : biji kedelai kultivar Cikuray, NaCl, alcohol 70%, feno-safranin, medium B5, vitamin B5, vitamin B51, 2,4-D, hidrolisat kasein, eksplan hipokotil, natrium hipoklorit 1%.

Penelitian menggunakan Ran-cangan Acak Lengkap pola factorial 7x2. Faktor pertama: konsentrasi NaCl, terdiri dari 7 taraf yaitu 0 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 1,25 ; dan 1,50%. Faktor kedua : jenis vitamin, terdiri dari 2 taraf yaitu B5 (kontrol) dan B51.

#### **Pembuatan Medium**

Medium induksi kalus menggunakan medium padat B5 + 3,5mg/L 2,4-D. Medium untuk kultur suspensi sel dengan perlakuan NaCl adalah medium cair B5 yang diberi vitamin B5 (kontrol) dan medium cair B5 yang diberi vitamin B51. Pada medium cair B5 tersebut ditambahkan 2,4-D (3,5 mg/ L), hidrolisat kasein 600 mg/ L, pl-I 5,5. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 Psi selama 15 menit.

#### **Induksi Kalus dan Kultur Suspensi Sel**

Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus adalah hipokotil kecambah yang perkecambahannya dilakukan secara aseptik. Kalus yang terbentuk setelah 4 minggu disub-kultur ke medium baru dan digunakan sebagai inokulan. Kalus meremah 0,25 g dimasukkan dalam 20 mL medium cair B5 yang mengandung vitamin B5 (kontrol) dan medium cair B5 yang mengandung vitamin B51.

Kultur diagitasi 120 rpm dan diinkubasi pada suhu kamar dengan pencahayaan 1500 lux. Kultur setelah berumur 2 minggu disubkultur ke medium baru. Dua minggu kemudian dihitung jumlah selnya setiap hari sampai didapat kurva pertumbuhannya. Kurva pertumbuhan digunakan untuk menentukan waktu yang tepat dalam memberikan perlakuan NaCl., yaitu pada fase eksponensial.

#### **Pemberian Perlakuan NaCl dan Pengamatan**

Pada fase eksponensial (hari ke- 7), ke dalam medium ditambahkan NaCl dalam berbagai konsentrasi. Pengamatan dilakukan terhadap parameter jumlah sel pada hari ke-0, 3, 6 dan 9 setelah perlakuan NaCl; viabilitas sel pada hari ke-0, 3, 6, dan 9 setelah perlakuan NaCl; dan berat kering sel dihitung pada hari ke—9 setelah perlakuan NaCl

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

##### **Jumlah Sel**

Penghitungan jumlah sel dilakukan setiap 3 hari selama 9 hari. Hasil Anava menunjukkan bahwa perlakuan NaCl pada medium cair B5 yang mengandung vitamin B5 maupun B51 serta interaksi kedua faktor tersebut berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah sel pada hari ke-3, 6 dan 9 setelah perlakuan. Analisis dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan, hasilnya tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata jumlah sel pada medium yang mengandung vitamin B5 dan B51 dengan penambahan NaCl pada hari ke-3, 6 dan 9 setelah perlakuan

Konsentrasi NaCl (%)	Rata-rata jumlah sel (x 1000/mL) pada hari ke-					
	3		6		9	
	B5	B51	B5	B51	B5	B51
0,00	118 (A) (d)	144 (B) (d)	144 (A) (e)	176 (B) (f)	110 (A) (d)	164 (B) (e)
0,25	76 (A) (bc)	108 (B) (c)	94 (A) (cd)	144 (B) (e)	56 (A) (c)	106 (B) (d)
0,50	70 (A) (b)	88 (B) (b)	86 (A) (c)	88 (A) (d)	62 (A) (c)	80 (B) (c)
0,75	86 (A) (c)	80 (A) (b)	96 (B) (d)	76 (A) (c)	68 (A) (c)	70 (A) (c)
1,00	62 (A) (ab)	58 (A) (a)	56 (A) (b)	60 (B) (b)	50 (A) (bc)	52 (A) (b)
1,25	56 (A) (a)	56 (A) (a)	52 (A) (b)	54 (A) (b)	46 (A) (b)	48 (A) (b)
1,50	60 (A) (a)	54 (A) (a)	42 (A) (a)	50 (A) (a)	30 (A) (a)	36 (A) (a)

Ket : Huruf kecil yang berbeda ke arah kolom dan huruf kapital yang berbeda ke arah baris menunjukkan berbeda sangat nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 1%

Pada Tabel 1 tampak bahwa jumlah sel menurun sejalan dengan waktu dan meningkatnya konsentrasi NaCl. Jumlah sel terendah 3.104 dan 3.6.104 sel/mL berturut-turut untuk medium yang mengandung vitamin B5 dan B51 pada hari ke-9 dengan konsentrasi NaCl tertinggi 1,50%.

Pada hari ke-6, sel mencapai jumlah tertinggi pada konsentrasi NaCl 0 sampai 0,50% baik untuk medium yang mengandung vitamin B5 maupun B51. Hal ini terjadi karena sel mulai teradaptasi dengan kondisi salin. Pemberian larutan salinitas ringan pada tahap pertumbuhan dapat meningkatkan ketahanan sel terhadap salinitas berat (Levitt, 1989 dalam Pangaribuan, 2003). Diperkirakan pula bahwa pada hari ke-6 belum mencapai ambang batas kritis dimana akumulasi ion masih dapat

ditoleransi sel sehingga tidak berefek toksik (Pangaribuan, 2003).

Pada hari ke-3 dan 9, jumlah sel tertekan, karena pada hari ke-3 sel mendapat cekaman salinitas secara mendadak. Pangaribuan (2003) menyatakan bahwa sel yang mengalami cekaman dapat menurunkan tekanan osmotiknya tanpa kehilangan turgor kecuali jika salinitas terjadi secara mendadak. Sedangkan pada hari ke-9, diduga sel sudah mencapai ambang batas kritis terhadap cekaman NaCl yang diberikan.

Pada Tabel 1 tampak bahwa vitamin B51 dapat menahan laju penurunan jumlah sel dibandingkan dengan jumlah sel pada medium yang mengandung vitamin B5 menurun tajam. Hal ini berhubungan dengan pengaruh vitamin B51 terhadap sintesis pmlin. Biosintesis prolin

merupakan proses biokimia esensial selama pembelahan dan pertumbuhan sel (Kandpal 8: Ra0, 1985 dalam El-Nany, 1995). Vitamin B51 mengandung asam folat dan asam pantotenat yang berperan dalam mempercepat proliferasi jaringan (George 8: Sherington, 1984).

**Viabilitas Sel**

Hasil Anava menunjukkan bahwa penambahan NaCl pada medium yang mengandung vitamin B (kontrol) dan pada medium yang mengandung vitamin B51 berpengaruh sangat nyata terhadap viabilitas sel pada hari ke-3, 6 dan 9, sedangkan interaksinya hanya berpengaruh nyata pada hari ke-9. Hasil uji jarak berganda Duncan tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata viabilitas sel pada medium yang mengandung vitamin B5 dan B51 dengan penambahan NaCl pada hari ke-3, 6 dan 9 setelah perlakuan

Konsentrasi NaCl (%)	Rata-rata viabilitas sel (%) pada hari ke-					
	3		6		9	
	B5	B51	B5	B51	B5	B51
0,00	78,64 (A) (b)	83,30 (A) (b)	76,29 (A) (c)	82,62 (A) (d)	76,93 (A) (d)	84,15 (B) (f)
0,25	72,62 (A) (b)	67,36 (A) (b)	71,02 (A) (c)	66,41 (A) (d)	71,43 (A) (d)	66,04 (A) (d)
0,50	63,62 (A) (b)	71,52 (A) (b)	67,39 (A) (c)	75,79 (A) (d)	67,74 (A) (c)	72,70 (A) (e)
0,75	67,43 (A) (b)	70,59 (A) (b)	67,32 (A) (c)	62,43 (A) (c)	67,65 (A) (c)	67,11 (A) (d)
1,00	43,46 (A) (ab)	61,87 (A) (a)	43,13 (A) (b)	61,09 (A) (b)	34,00 (A) (b)	58,00 (B) (c)
1,25	40,78 (A) (a)	46,19 (A) (a)	38,49 (A) (b)	43,19 (A) (b)	34,22 (A) (b)	40,62 (A) (b)
1,50	20,33 (A) (a)	27,52 (A) (a)	17,86 (A) (a)	24,80 (A) (a)	12,50 (A) (a)	17,20 (A) (b)

Ket : Huruf kecil yang berbeda ke arah lola dan huruf kapital yang berbeda ke arah baris menunjukkan berbeda sangat nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 1%.

Pada Tabel 2 tampak bahwa viabilitas sel menurun sejalan dengan waktu dan meningkatnya konsentrasi NaCl. Hari ke-3 setelah perlakuan, viabilitas sel pada medium yang mengandung vitamin B5

dengan NaCl 1 — 1,5% dan pada medium yang mengandung vitamin B51 dengan NaCl 1,25 — 1,5% sangat rendah jika dibandingkan dengan viabilitas sel pada konsentrasi NaCl di bawahnya. Hal

ini menunjukkan bahwa NaCl di atas 1% dapat menyeleksi sel kedelai kultivar Ciku-ray yang toleran terhadap NaCl 1%.

Hari ke-6 dan 9 setelah perlakuan, baik pada medium yang mengandung vitamin B5 maupun pada medium yang mengandung vitamin B51 dengan konsentrasi NaCl tertinggi (1,5%), viabilitasnya sangat rendah jika dibandingkan dengan viabilitas sel pada tingkat konsentrasi NaCl di bawahnya (0% — 1,25%). Rata-rata viabilitas sel pada konsentrasi NaCl 1,50% kurang dari 60%. Hasil ini menunjukkan masih di bawah syarat kultur yang baik, karena menurut Chen et al. (1990) kultur suspensi yang baik (memiliki kualitas pertumbuhan yang baik) harus memiliki viabilitas sel lebih dari 60%.

Interaksi antara penambahan vitamin B51 dengan NaCl terhadap viabilitas sel terjadi pada hari ke-9 setelah perlakuan, terutama pada konsentrasi NaCl 0,50%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin B51 dapat menahan penurunan viabilitas sel daripada pemberian vitamin

B5. Ini dapat belum cukup tinggi untuk menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel, sehingga pembelahan sel masih dapat berlangsung dengan normal (Yi-Zhi 8: Tian, 2000). Selain itu juga dapat terjadi karena komposisi vitamin B51 mengandung persenyawaan yang lebih kompleks daripada vitamin B5. Interaksi yang sama terjadi pada hari ke-9 diduga berkaitan dengan pengaruh vitamin dalam medium yang hanya dibutuhkan sebagai katalis dalam proses metabolisme sel. Katalisator ini hanya dibutuhkan pada saat akumulasi NaCl sudah dapat menginduksi proliferasi yaitu protein yang disintesis khusus pada saat ada cekaman. Diduga pada penelitian ini, sintesis proliferasi yang dapat monkan efek inhibitor NaCl (El-Nany, 1995) baru terjadi pada hari ke-9.

#### Barat Kering Sel

Hasil Anava menunjukkan bahwa penambahan vitamin B51 dan NaCl serta interaksinya berpengaruh sangat nyata terhadap berat kering sel. Hasil analisis lanjut menggunakan Uji Duncan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata berat sel pada medium yang mengandung vitamin B5 dan B51 dengan penambahan NaCl pada hari ke-9 setelah perlakuan

Konsentrasi NaCl (%)	Rata-rata berat kering sel (mg)	
	Vitamin B5	Vitamin B51
0,00	160 (A) (f)	260,00 (B) (f)
0,25	86 (A) (c)	160,00 (B) (e)
0,50	95 (A) (d)	125,00 (B) (b)
0,75	102,5 (A) (e)	115,00 (A) (d)
1,00	60,00 (A) (b)	90,00 (B) (c)
1,25	54,00 (A) (b)	67,00 (A) (b)
1,50	32,00 (A) (a)	40,00 (A) (a)

Ket : Huruf kecil yang berbeda ke arah kolom dan huruf kapital yang berbeda ke arah baris menunjukkan berbeda sangat nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 1%

Pada Tabel 3 tampak bahwa berat kering sel menurun dengan mening-katnya konsentrasi NaCl, baik pada medium yang mengandung vitamin B5 ataupun B51. NaCl tampaknya menghambat pertumbuhan dan vitamin B51 mampu meminimalkan efek hambatan pertumbuhan yang ditimbulkan NaCl. Hal ini terlihat dari berat kering sel pada medium yang mengandung vitamin B51 lebih besar daripada berat kering sel pada medium yang mengandung vitamin B5 (kontrol). Interaksi antara vitamin B51 dengan NaCl terhadap berat kering terjadi pada konsentrasi NaCl 1%. Sedangkan pada konsentrasi NaCl 1,25 dan 1,5%, berat kering sel baik pada medium yang mengandung vitamin B5 maupun yang mengandung vitamin B51 mengalami penurunan yang signifikan. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi garam yang tinggi dapat menyebabkan stress hiperosmotik sehingga mem-pengaruhi penyerapan air dan stress ketidakseimbangan nutrien.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, B., S. K. Budiarto. 2000. *Penyelamatan Plasma Nuq'ah Kedelai Melalui Teknik In vitro*. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor.
- Chen, Z., D.a. Evans, 8: W. R. Sharp. 1990. *Handbook of Plant Cell Culture*. McGraw-Hill Inc., New York.
- Dixon, R.A & R.A. Gonzales. 1994. *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, 2nd Ed. Plant Biology Division. Oxford Univ. Press, New York.
- El—Enamy, A.E. 1995 Proline Effect on Shoot Organogenesis and Protein Synthesis in Salinity- Stressed Tomato Culture. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 8 (3). Department of Botany. Faculty of Science, 'Assiut University, Assiut.
- George, E.F. 8: P.D. Sherrington. 1884. *Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook & Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Limited, London.
- Harnowo, D. 2000. Pertumbuhan ' kecambah kedelai akibat cekaman salinitas. *Prosiding Lokakarya Penelitian dan Pengembangan Produksi Kedelai di Indonesia*. Balai Penerlitan A Tanaman Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian, Malang.
- Maesen, L.]G.V.D 8: S. Somaatmaja. 1993. PROSEA. *Sumber Daya Nabati Asia Tenggara l. Kacang-Kacangan*. Penelitan PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Naiola, B.P. 1995. Estimasi Osmotic Adjustment dan Akumulasi Prolin sebagai Komponen Osmotikum Sitolutepada Kedelai dalam Stres salinitas NaCl. *Prosiding Kongres Ilmu Pengetahuan Nasional VI*. 224-235. LIPI. Jakarta.
- Narayanaswamy, S. 1994. *Plant and Tissue Culture*. Tata McGraw-Hill Publishing Comp. NewDelhi.
- Pangaribuan, N. 2003. Pengaruh Hardening pada tanaman bayam terhadap toleransi NaCl. Jurusan

Biologi, FMIPA Universitas  
Terbuka. Bogor URL

[http://www.google.com/master/nu  
rmaalapangaribuan/html.11062003](http://www.google.com/master/nu<br/>rmaalapangaribuan/html.11062003)

- Rath, I. 1998. *Alunzunium Toxicity in Soybean Sell Cultures. Proceedings og Workshop on Soybean Biotechnology for ALuznuniunz Tolerance on acid Soils and Disease Resistance.* Central Research Institute for Food Crops. Bogor
- Soeryowinoto. M. 1996. *Pernulian Tanaman Secara In Vitro.* PAU-Bioteknologi. UGM. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Suharsi, T.K. 1991. *Pengaruh pelernbaban benih kedelai dengan larutan . NaCl terhadap kenzapanan beradaptasi pada tanah salin.* Laboratorium Ilmu dan Teknologi Benih. Fakultas `Pertanian. IPB. Bogor.
- Yi—Zhi, Z. & L. Tian. 2000. Changes of Proline and Absciscic Acid Content in Tolerant/ Sensitive Cultivars of Soybean under Osmotic Condition. *Soybean Genetic Newsletter* 27. [online journal]URL.