

# Seleksi *In Vitro* Embrio Somatik Kacang Tanah pada Medium dengan Polietilen Glikol untuk Simulasi Kondisi Cekaman Kekeringan

Enni Suwarsi Rahayu<sup>1)</sup>, Satriyas Ilyas<sup>2)</sup> dan Sudarsono<sup>2)\*</sup>

<sup>1)</sup>Lab Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura,  
Fakultas Pertanian, IPB, Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>2)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Semarang  
Jl Raya Sekaran Gunungpati, Semarang 50229

\*)Korespondensi : e-mail: agrspisib@indo.net.id; fax: 0251-629347

Diterima Agustus 2005 disetujui untuk diterbitkan Januari 2006

## Abstract

*This study was aimed to evaluate the effectiveness of in vitro selection for identifying PEG insensitive somaclonal variant of peanut somatic embryos (SE). In one of the experiments, evaluation on responses of four peanut cultivars against selective medium containing polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) was conducted and sub-lethal concentration of PEG was determined. In the other experiment, in vitro selection on selective medium containing sub-lethal level of PEG was conducted to identify PEG insensitive SE of peanut. Secondary SE of peanut cv. Badak, Kelinci, Singa, and Zebra were cultured on liquid MS medium supplemented with 16  $\mu$ M of picloram and 5%, 10%, 15%, or 20% of PEG 6000. Survival of explant, average number of proliferated SE/explant, and total number of proliferated SE after in vitro selection were recorded monthly, up to three months. Sub-lethal level of PEG was defined as one inhibiting more than 95% of the total number of proliferated SE. In vitro selection on medium supplemented with sub-lethal level of PEG 6000 was conducted on at least 4000-5000 SE of peanut cv. Kelinci and Singa. The PEG insensitive SE was identified after subsequent three months of in vitro selection. The results showed that supplementation of PEG 6000 on medium for induction of SE inhibited proliferation of peanut SE. Sub-lethal level was obtained at 15% concentration of PEG 6000. The frequencies of obtaining PEG insensitive SE of peanut cv. Kelinci was 8% to 10% and for peanut cv. Singa was 10% to 12%. The R0 plants of peanut cv. Kelinci (62 R0 plants) and Singa (48 R0 plants) regenerated from PEG insensitive SE were obtained and grown in the glasshouse to produce R1 and R2 seeds.*

**Key words:** PEG stress, PEG 6000, embryo somatic, somaclonal variance

## Pendahuluan

Hasil panen tanaman kacang tanah di lahan dengan cekaman kekeringan pada umumnya relatif rendah. Kondisi ini diharapkan dapat ditingkatkan melalui penggunaan kultivar tanaman kacang tanah yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Untuk memperoleh plasma nutfah kacang tanah yang toleran terhadap cekaman kekeringan dapat dilakukan seleksi *in vitro* terhadap sel/jaringan dalam medium selektif yang tepat karena secara teoretis cara seperti ini sangat efisien untuk mendapatkan varian sel/jaringan tanaman dengan karakteristik tertentu (Maluszynski *et al.*, 1995).

Tanaman varian dengan sifat unggul tertentu telah dapat diregenerasikan dari sel/jaringan varian hasil seleksi *in vitro*. Keberhasilan pengembangan metode seleksi *in vitro* memerlukan tersedianya (a) metode kultur jaringan yang efektif untuk regenerasi tanaman dari sel varian dalam jumlah besar, (b) agen penyeleksi yang dapat menginduksi

perkembangan dan proliferasi jaringan varian tetapi menghambat/mematikan jaringan normal, dan (c) adanya korelasi antara fenotipe hasil seleksi pada tingkat sel dan fenotipe pada tingkat tanaman (Hammerschlag, 1988).

Kultur embrio somatik (ES) kacang tanah yang efisien untuk meregenerasikan tanaman varian telah dibakukan. Teknik yang dikembangkan terbukti mampu menginduksi keanekaragaman sifat kualitatif dan kuantitatif serta toleransi terhadap toksin yang disekresikan cendawan *Sclerotium rolfsii* (Yusnita *et al.*, 2005). Keanekaragaman di antara kultur ES kacang tanah diduga juga berpotensi untuk menghasilkan varian ES dengan sifat toleran terhadap cekaman kekeringan. Untuk itu perlu dikembangkan metode baku seleksi *in vitro* yang dapat digunakan untuk mengisolasi varian ES kacang tanah yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Penyiraman larutan polietilen glikol (PEG) pada medium tanaman dalam pot terbukti menghambat pertumbuhan tanaman dan dapat digunakan untuk menapis respon tanaman kacang tanah terhadap cekaman kekeringan (Nursusilawati, 2003). Kecambah dan tunas kacang tanah yang ditumbuhkan dalam medium *in vitro* dengan penambahan PEG 5% hingga 20% juga terhambat pertumbuhan dan perkembangannya. Penghambatan yang terjadi berkorelasi dengan respon genotipe kacang tanah terhadap cekaman kekeringan di lapang. Perlakuan PEG pada kecambah dan tunas kacang tanah tersebut juga menginduksi akumulasi prolin pada jaringan seperti respon terhadap cekaman kekeringan (Rahayu *et al.*, 2004, Rahayu *et al.*, 2005). Meskipun data yang ada mengindikasikan bahwa PEG dapat digunakan untuk menyimulasi kondisi cekaman kekeringan secara *in vitro*, masih perlu dilakukan evaluasi atas efektivitasnya sebagai agen penyeleksi pada tingkat sel dalam isolasi ES yang toleran (insensitif) dan produksi tanaman varian yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas metode seleksi *in vitro* guna memperoleh varian kacang tanah yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Dalam penelitian ini dilakukan evaluasi respon ES empat kultivar kacang tanah terhadap medium selektif dengan penambahan PEG, kondisi subletal yang menghambat pertumbuhan dan proliferasi ES, dan regenerasi tanaman R0 kacang tanah dari ES hasil seleksi *in vitro* yang insensitif terhadap cekaman PEG.

## **Materi dan Metode**

Dalam penelitian ini digunakan kacang tanah cv. Badak, Kelinci, Singa, dan Zebra. Kultivar Badak diduga peka terhadap cekaman kekeringan (Rahayu *et al.*, 2005), sedangkan Kelinci medium toleran (Sudarsono *et al.*, 2004) dan Singa toleran (Hidayat *et al.*, 1999; Nursusilawati, 2003). Sementara itu, Zebra belum diketahui responnya terhadap cekaman kekeringan. Benih kacang tanah yang digunakan diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika (Balitbiogen), Bogor. Benih ini digunakan sebagai sumber eksplan daun embrio untuk induksi ES.

Benih kacang tanah disterilkan dengan larutan pemutih komersial (100%) mengikuti prosedur baku yang telah dipublikasikan (Yusnita *et al.*, 2005). Daun embrio yang diisolasi dari poros embrio diinduksi untuk membentuk ES primer dan ES sekunder dalam medium MS (Murashige dan Skoog, 1962) padat dengan penambahan pikloram 16  $\mu\text{M}$  (medium MS-P16). Kultur daun embrio disubkultur setiap bulan ke dalam medium MS-P16 yang masih segar dan diinkubasi dalam ruang kultur bersuhu 25°C tanpa penyinaran hingga terbentuk kalus embriogen dengan ES sekunder. Perlakuan inkubasi dalam ruang kultur bersuhu 25°C tanpa penyinaran digunakan untuk semua percobaan, kecuali jika disebutkan lain.

Percobaan dilakukan menggunakan kalus embriogen dan ES sekunder kacang tanah keempat kultivar tersebut di atas. Unit percobaan terdiri atas satu botol kultur yang ditanami

lima eksplan kalus embriogen dengan 8 hingga 10 ES sekunder berumur satu bulan sejak subkultur yang terakhir. Setiap kombinasi perlakuan diulang lima kali.

Eksplan ditanam dalam media MS-P16 cair dengan penambahan PEG 6000 sebanyak 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20%, yang masing-masing mempunyai potensial osmotik setara dengan 0,00 -0,03; -0,19; -0,41, dan -0,67 MPa (Michel dan Kaufmann, 1973). Medium selektif cair (25 ml) dituangkan ke dalam botol kultur volume 150 ml. Di atas medium diletakkan busa sintesis dan kertas saring agar eksplan yang ditanam tidak tenggelam. Eksplan disterilkan dengan pemanasan selama 20 menit pada suhu 121°C serta tekanan 1,20 bar menggunakan autoklaf.

Respon kalus embriogen dan ES kacang tanah terhadap medium selektif diamati setiap bulan selama tiga bulan. Konsentrasi PEG subletal dalam medium selektif ditentukan berdasarkan atas hasil penelitian sebelumnya (Nabors dan Dykes, 1985; Yusnita *et al.*, 2005), yaitu berupa konsentrasi PEG yang dapat menghambat jumlah total ES lebih dari 95% bila dibandingkan dengan PEG 0%.

Identifikasi varian yang insensitif terhadap kondisi cekaman akibat penambahan PEG subletal dilakukan terhadap kalus embriogen dan ES sekunder kacang tanah cv. Kelinci dan Singa yang telah mengalami subkultur berulang dalam medium MS-P16 selama minimal enam bulan sejak terbentuknya ES sekunder. Pada awal percobaan ditanam 500 kalus embriogen, masing-masing dengan 8 hingga 10 ES sehingga jumlah total yang diseleksi mencapai 4000 hingga 5000 ES untuk setiap kultivar. Kalus embriogen (lima eksplan per botol) ditanam dalam medium selektif dan disubkultur setiap bulan ke dalam medium selektif yang masih segar. Setelah tiga bulan, ES yang masih hidup diisolasi dan diregenerasikan menjadi tanaman.

ES hasil seleksi *in vitro* yang insensitif terhadap cekaman PEG subletal ditanam dalam medium MS-P16 tanpa penambahan PEG selama dua bulan untuk proliferasi ES. Penanaman ES dalam medium MS dilakukan dengan penambahan arang aktif 2 g/l (medium MSAC) dan inkubasi selama tiga minggu sehingga ES berkembang sempurna. Pengecambahan ES, induksi pembentukan tunas, dan regenerasi plantlet dilakukan mengikuti prosedur baku yang telah dilaporkan sebelumnya (Yusnita *et al.*, 2005).

Plantlet kacang tanah dengan 3 hingga 4 daun dan perakaran yang normal dipindahkan dari medium *in vitro* ke medium tanah melalui proses aklimatisasi. Akar plantlet dicuci bersih dari agar yang menempel, direndam dalam suspensi fungisida *Dithane* M45 (2 g/l), dan ditanam dalam pot plastik dengan volume 200 ml yang berisi medium tanam steril berupa campuran tanah, kompos, dan pasir dengan perbandingan 2 : 1 : 1 (v/v). Plantlet disungkup dengan botol kultur untuk menjaga kelembaban dan diletakkan selama dua minggu pada rak kultur dengan pencahayaan 1000 lux terus-menerus selama 24 jam. Plantlet disiram dengan larutan MS ( $\frac{1}{2}$  konsentrasi) jika permukaan medium tanam mengering.

Setelah menghasilkan daun dan perakaran baru, plantlet dipindahkan ke rumah kaca dan sungkup botol dibuka secara bertahap. Tanaman yang berhasil tumbuh dipindahkan ke dalam pot dengan diameter 50 cm dan tinggi 40 cm yang berisi 10 kg campuran tanah, kompos, dan pasir dengan perbandingan 1:1:1 (v/v). Selanjutnya, tanaman dipelihara di rumah kaca untuk menghasilkan benih R1 dan untuk pengamatan pertumbuhan tanaman.

## Hasil dan Pembahasan

Satu dan dua bulan setelah eksplan berada dalam medium selektif, penambahan PEG dalam medium tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan eksplan (data tidak ditampilkan). Setelah tiga bulan dalam medium selektif, persentase eksplan yang hidup untuk kacang tanah cv. Badak telah nyata menurun pada perlakuan PEG 10%, sedangkan untuk ketiga kultivar lainnya penurunan terjadi pada penambahan PEG 15%. Pada konsentrasi PEG 20%, semua eksplan kacang tanah cv. Badak dan Zebra telah mati. Rataan ES per

eksplan dan jumlah total ES hasil seleksi kacang tanah cv. Badak dan Zebra telah sangat menurun pada perlakuan penambahan PEG 10%. Eksplan kacang tanah cv. Badak sudah tidak mampu membentuk ES mulai perlakuan PEG 15%, sedangkan kacang tanah cv. Zebra tidak mampu membentuk ES pada perlakuan PEG 20%. Pada konsentrasi PEG 20%, eksplan kacang tanah cv. Singa dan Kelinci masih dapat membentuk ES (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi PEG terhadap persentase eksplan yang hidup, rata-rata embrio somatik (ES) yang terbentuk per eksplan dan jumlah total ES kacang tanah cv. Badak, Kelinci, Singa, dan Zebra setelah tiga bulan dalam media selektif  
Table 1. The effect of PEG concentration on survival of explant, average number of proliferated SE/explant and total number of proliferated SE of peanuts cv. Badak, Kelinci, Singa, and Zebra after three months in a selective medium

Konsentrasi PEG (%)	Kultivar kacang tanah			
	Badak	Kelinci	Singa	Zebra
	<b>Persentase eksplan yang hidup (%)</b>			
0	100 aA	100 aA	96 aA	100 aA
5	92 aB	100 aA	96 aA	100 aA
10	60 bB	88 aA	88 aA	88 aA
15	40 cA	44 bA	44 bA	48 bA
20	0 dC	40 bA	16 cB	0 cC
	<b>Rataan ES yang terbentuk per eksplan</b>			
0	32.1 aC	36.0 aA	34.4 aB	30.3 aD
5	25.6 bA	25.2 bA	23.5 bB	15.9 bC
10	2.6 cC	11.2 cA	12.2 cA	4.4 cB
15	0.0 dB	3.4 dA	3.6 dA	4.7 cA
20	0.0 dA	0.9 eA	1.2 eA	0.0 dA
	<b>Jumlah total ES</b>			
0	161 aB	180 aA	164 aB	162 aB
5	168 bA	117 bA	112 bA	80 bB
10	9 cB	50 cA	54 cA	19 cB
15	0 cA	7 dA	8 dA	11 cdA
20	0 cA	2 dA	1 dA	0 dA

*Keterangan:* pada setiap peubah, angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom dan huruf kapital yang sama pada baris, tidak berbeda nyata menurut uji Jarak Berganda Duncan dengan  $\alpha=0.05$ .

Dalam medium *in vitro* tanpa penambahan PEG, kalus embriogen mampu berkembang sempurna membentuk banyak ES (Gambar 1a dan 1b). Penambahan PEG terbukti mampu menghambat perkembangan dan proliferasi eksplan kalus embriogen dan ES kacang tanah cv. Badak, Kelinci, Singa, dan Zebra. Pengaruh negatif PEG diduga sebagai akibat kemampuan PEG untuk menurunkan potensial osmotik larutan. Subunit etilen oksida pada senyawa polimer PEG diketahui mampu menahan air dengan membentuk ikatan hidrogen (Steuter, 1981). Akibatnya, dalam medium selektif yang mengandung PEG, molekul air menjadi tidak tersedia bagi jaringan tanaman yang dikulturkan meskipun sebenarnya terdapat di dalam larutan medium.

Pengaruh negatif PEG terhadap perkembangan dan proliferasi ES dalam medium selektif diduga juga terjadi karena terhambatnya berbagai proses fisiologi di dalam sel/jaringan yang dikultur. PEG juga dilaporkan berpengaruh terhadap kandungan poliamin endogen yang berperan dalam proses proliferasi ES (Kong *et al.*, 1998). Dengan demikian, ES yang terlihat insensitif terhadap cekaman PEG subletal diduga mengadopsi mekanisme baru yang dapat mengatasi pengaruh negatif PEG terhadap proliferasi ES kacang tanah.

Tabel 2. Persentase penurunan jumlah eksplan yang hidup, rataan embrio somatik (ES) per eksplan dan jumlah total ES kacang tanah cv. Badak, Kelinci, Singa, dan Zebra setelah tiga bulan dalam media selektif dengan penambahan PEG 6000 5%, 10%, 15% atau 20% bila dibandingkan dengan medium PEG 0%.

Table2. Percentage of reduction of explant survival, average number of proliferated SE/explant and total number of proliferated SE of peanuts cv. Badak, Kelinci, Singa, and Zebra after three months in a selective medium with 5%, 10%, 15% or 20% PEG 6000 compare to medium with PEG 0%

Konsentrasi PEG (%)	Nilai penurunan (%) untuk kacang tanah:			
	Badak	Kelinci	Singa	Zebra
	<b>Persentase eksplan yang hidup (%)</b>			
0	0	0	0	0
5	8	0	0	0
10	40	12	8	12
15	60	56	54	52
20	100	60	83	100
	<b>Rataan ES yang terbentuk per eksplan</b>			
0	0	0	0	0
5	20	29	32	48
10	92	69	65	85
15	100	91	90	85
20	100	97	97	100
	<b>Jumlah total ES hasil seleksi</b>			
0	0	0	0	0
5	27	29	32	47
10	95	73	67	87
15	100	96	96	93
20	100	99	99	100

Keterangan: Persentase penurunan (PP, %) dihitung dengan rumus

$$PP = \left( \frac{np0 - npN}{np0} \right) * 100\% ;$$

np0 = nilai peubah pengamatan pada perlakuan PEG 0%

npN = nilai peubah pengamatan pada perlakuan PEG 5, 10, 15, atau 20%

Meskipun secara umum meningkatnya konsentrasi PEG dalam medium selektif menyebabkan meningkatnya pengaruh negatif PEG, keempat kultivar kacang tanah yang diuji ternyata memberikan respon berbeda terhadap cekaman PEG yang diberikan. Dalam penelitian ini proliferasi ES kacang tanah cv. Badak paling sensitif terhadap cekaman PEG bila dibandingkan dengan ES kacang tanah cv. Kelinci atau Singa (Tabel 1), yang berarti sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya (Rahayu *et al.*, 2005; Sudarsono *et al.*, 2004; Hidayat *et al.*, 1999; Nursusilawati, 2003). Kacang tanah cv. Zebra belum diketahui responnya terhadap cekaman kekeringan. Dari data yang ada, proliferasi ES kacang tanah cv. Zebra nampak mempunyai respon yang menyerupai respon kacang tanah cv. Badak sehingga cultivar ini diduga termasuk ke dalam kelompok yang peka terhadap cekaman kekeringan.

Perbedaan respon terhadap PEG di antara kultivar kacang tanah yang berbeda toleransinya terhadap cekaman kekeringan memperkuat indikasi bahwa PEG dapat digunakan sebagai agen penyeleksi (*selective agent*) dalam seleksi *in vitro* kacang tanah. Dalam percobaan sebelumnya PEG juga terbukti berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan tunas kacang tanah secara *in vitro*, dan pengaruhnya berbeda antara satu kultivar dan kultivar lainnya, bergantung kepada tingkat toleransi kultivar terhadap cekaman kekeringan (Rahayu *et al.*, 2005).

Tiga bulan setelah eksplan berada dalam medium selektif, penambahan PEG 20% untuk kacang tanah cv. Singa menyebabkan penurunan persentase eksplan yang hidup sebesar 83%. Sementara itu, penurunan persentase eksplan yang hidup untuk Kelinci, Badak, dan Zebra masing-masing 60%, 100%, dan 100% bila dibandingkan dengan persentase pada perlakuan PEG 0%. Rataan ES kacang tanah cv. Badak yang terbentuk per eksplan setelah tiga bulan berada dalam medium selektif dengan penambahan PEG 15% telah menurun hingga 100% bila dibandingkan dengan perlakuan PEG 0%. Untuk kacang tanah cv. Kelinci, Singa, dan Zebra pada konsentrasi PEG 20% hanya terjadi penurunan 85% hingga 91%. Penurunan jumlah total ES  $\geq 95\%$  untuk kacang tanah cv. Badak telah terjadi pada perlakuan PEG 10%, sedangkan untuk Singa dan Kelinci penurunan tersebut terjadi pada PEG 15%. Untuk Zebra penurunan jumlah total ES  $\geq 95\%$  terjadi pada PEG 20% (Tabel 2).

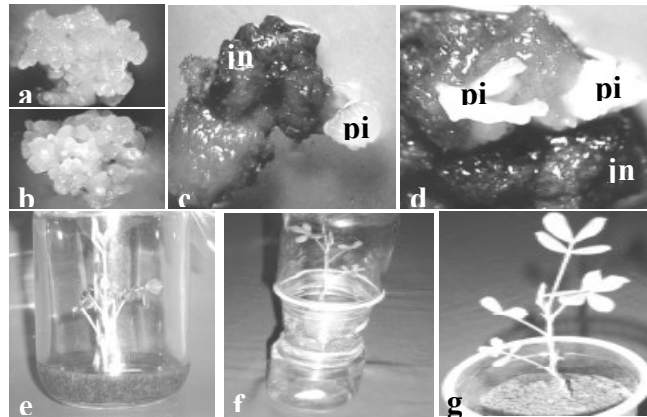
Dalam seleksi *in vitro*, kondisi selektif yang digunakan harus dapat memproliferasikan sel/jaringan varian yang diinginkan dan menghambat pertumbuhan sel/jaringan normal yang tidak diinginkan sehingga kemungkinan terjadinya kesalahan identifikasi dapat diperkecil. Dari hasil pengamatan di atas, penambahan PEG dalam medium MS-P16 dengan konsentrasi 15% ditentukan sebagai konsentrasi subletal dalam seleksi *in vitro* kacang tanah. Medium selektif dengan penambahan PEG 15% dengan tiga kali subkultur selama tiga bulan berturut-turut selanjutnya digunakan dalam percobaan untuk mengisolasi ES kacang tanah yang insensitif terhadap cekaman PEG.

Kondisi subletal dalam seleksi *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan seleksi dan menurunkan terjadinya *escaped* (Nabors dan Dykes, 1985). Pada medium dengan PEG 15%, jumlah total ES yang didapatkan dari hasil seleksi *in vitro* telah menurun lebih dari 95% bila dibandingkan dengan jumlah total ES pada perlakuan PEG 0%. Sebanyak 5% ES sisanya yang tumbuh diharapkan merupakan ES yang insensitif terhadap cekaman PEG.

ES kacang tanah yang insensitif terhadap cekaman PEG diharapkan dapat berkembang menjadi tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Identifikasi ES kacang tanah yang insensitif terhadap cekaman dalam medium selektif dengan penambahan PEG subletal merupakan langkah awal untuk membuktikan hal tersebut.

Setelah tiga bulan eksplan berada dalam medium selektif dengan konsentrasi PEG subletal, persentasenya yang tetap hidup mencapai 36% untuk kacang tanah cv. Kelinci dan 39% untuk kultivar Singa. Rataan jumlah ES per eksplan yang didapatkan masing-masing sebanyak 2,3 ES/eksplan untuk kultivar Kelinci dan 2,5 ES/eksplan untuk kultivar Singa. Dari sebanyak 4000 hingga 5000 ES awal yang diseleksi, jumlah total ES insensitif terhadap cekaman PEG yang diperoleh masing-masing mencapai 415 ES (8% hingga 10%) untuk kacang tanah cv. Kelinci dan 487 ES (10% hingga 12%) untuk Singa. Contoh ES insensitif PEG hasil seleksi *in vitro* dalam medium dengan PEG subletal dapat dilihat pada Gambar 1.c. dan 1.d.

Jumlah total ES insensitif terhadap cekaman PEG yang diperoleh mencapai lebih dari 5%. Hal ini dapat terjadi karena seleksi dilakukan terhadap ES yang telah mengalami subkultur berulang kali sehingga di antara 4000 hingga 5000 ES yang diseleksi ada yang mengalami variasi somaklonal menjadi lebih toleran daripada sel asalnya. Mekanisme fisiologi yang dilakukan tanaman agar insensitif/toleran terhadap potensial osmotik rendah antara lain berupa pembentukan protein struktural untuk menjaga integritas membran sel (Fernanda *et al.*, 1997), *down regulation* metabolisme sel (Leprince *et al.*, 2000), peningkatan aktivitas enzim *acidic-phosphatase* yang diperlukan untuk menjaga ketersediaan fosfat organik (Ehsanpour dan Amini, 2003), atau peningkatan akumulasi senyawa prolin dalam sel (Widoretno *et al.*, 2004). Mekanisme fisiologi yang bekerja pada ES kacang tanah insensitif terhadap cekaman PEG masih perlu dievaluasi.



Gambar 1. Proliferasi embrio somatik kacang tanah dalam media MS-P16 tanpa PEG atau dengan PEG 15% dan regenerasi plantlet (a) Kalus embriogen dan ES kacang tanah cv. Singa, (b) Kalus embriogen dan ES kacang tanah cv. Kelinci dalam medium MS-P16 tanpa penambahan PEG 6000 (PEG 0%), (c) Jaringan embriogen kacang tanah cv. Kelinci, (d) Jaringan embriogen kacang tanah cv. Singa dengan ES insensitif cekaman PEG di antara jaringan yang mati sebagai hasil seleksi *in vitro* pada medium dengan konsentrasi PEG subletal (15%), (e) pengakaran tunas, (f) aklimatisasi tanaman R0 - kacang tanah cv. Singa yang diregenerasikan dari ES insensitif cekaman PEG, dan (g) tanaman kacang tanah cv. Singa yang diregenerasikan dari ES hasil seleksi *in vitro*, berhasil bertahan hidup setelah tahapan aklimatisasi dan siap untuk ditanam di rumah kaca. (jn) – jaringan embriogen yang nekrosis akibat seleksi *in vitro* dalam medium dengan PEG 15%, (pi) – kalus embriogen dan ES yang insensitif cekaman PEG hasil seleksi *in vitro*, berkembang di antara jaringan yang mengalami kematian

Figure 1. Peanut somatic embryos proliferation on non selective (without PEG) or selective MS-P16 (with 15% PEG) medium and plantlet regeneration (a) Embryogenic callus and somatic embryo of peanut cv. Singa, (b) Embryogenic callus and somatic embryo of peanut cv. Kelinci in the medium MS-P16 without PEG 6000 (PEG 0%), (c) Embryogenic tissue of peanut cv. Kelinci, (d) Embryogenic tissue of peanut cv. Singa with somatic embryo insensitive to PEG stress among dead tissues as a result of *in vitro* selection in the medium with sublethal concentration (15%) of PEG, (e) shoot rooting, (f) acclimatization of R0 – peanut cv. Singa regenerated from somatic embryo insensitive to PEG stress, (g) peanut cv. Singa regenerated from somatic embryo of *in vitro* selection, successfully survive after acclimatization and ready to grow in the glasshouse. (jn) – embryogenic tissue suffering from necrosis as a result of *in vitro* selection in the medium with PEG 15%, (pi) – embryogenic callus and somatic embryo insensitive to PEG stress resulting from *in vitro* selection, which develop among dead tissues

Proliferasi ES hasil seleksi *in vitro* dalam medium MS-P16 tanpa PEG sebelum proses pengecambahan terbukti membantu meningkatkan keberhasilan regenerasi tunas R0 (data tidak ditampilkan). ES kacang tanah hasil seleksi *in vitro* yang insensitif terhadap cekaman PEG subletal telah dapat diregenerasikan menjadi tanaman. Namun, tidak semua ES insensitif cekaman PEG yang diperoleh dapat dikecambahkan dan diregenerasikan menjadi plantlet karena sebagian berkembang menjadi tunas atau plantlet abnormal. Setelah proses pengecambahan dan pengakaran (Gambar 2.e.), regenerasi plantlet (Gambar 2.f.), dan aklimatisasi (Gambar 2.g.), dalam percobaan ini dapat diperoleh 62 tanaman R0 kacang tanah cv. Kelinci dan 48 tanaman R0 kacang tanah cv. Singa. Tanaman yang diperoleh diharapkan mempunyai karakteristik yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Tanaman R0 tersebut telah ditumbuhkan di rumah kaca untuk menghasilkan benih R1 dan R2. Karakterisasi respon tanaman R1 dan R2 terhadap cekaman kekeringan akan dilakukan untuk membuktikan efektivitas seleksi *in vitro* menggunakan PEG untuk menghasilkan genotipe kacang tanah yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

## Kesimpulan

Larutan PEG dalam medium selektif dapat menghambat proliferasi ES kacang tanah dan tingkat penghambatan lebih dari 95% (subletal) didapatkan pada konsentrasi PEG 15%.

Sejumlah ES kacang tanah cv. Kelinci dan Singa yang insensitif terhadap cekaman PEG 15% diperoleh dari seleksi *in vitro* yang dilakukan dengan frekuensi 8% ingá 10% untuk kacang tanah cv. Kelinci dan 10% hingga 12% untuk kacang tanah cv. Singa. Tanaman R0 kacang tanah cv. Kelinci (62 tanaman) dan Singa (48 tanaman) dapat diregenerasikan dari ES yang insensitif terhadap cekaman PEG dan ditumbuhkan di rumah kaca untuk menghasilkan benih R1 dan benih R2. Evaluasi respon tanaman R1 dan tanaman R2 terhadap cekaman kekeringan akan dilakukan setelah benih R1 dan R2 tersedia.

### **Ucapan Terima Kasih**

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh proyek Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP) angkatan I berjudul "Rekayasa Genetika dan Seleksi *In vitro* untuk Mendapatkan Plasma Nutfah Kacang Tanah dengan Novel Characters: Toleran Cekaman Kekeringan dan Resisten terhadap Penyakit Busuk Batang *Sclerotium*" dengan nomor kontrak 340/P4T/DPPM/IV/2003 tanggal 25 April 2003. Selain itu, Enni S. Rahayu mendapatkan beasiswa BPPS, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia, untuk program S3 di Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak pendukung dana tersebut.

### **Daftar Pustaka**

- Ehsanpour, A.A. dan F. Amini. 2003. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under *in vitro* culture. *African J. Biotechnol.* 2:133-135.
- Fernanda, Q.H.M., S.H.M. del Soccoro dan G.C.R. Fernando. 1997. Cell wall proteins of *in vitro* culture of chili pepper lines differing in water stress tolerance. *Plant Sci.* 128:217-223.
- Hammerschlag, F.A. 1988. Somaclonal variation. In: Hammerschlag, F.A. dan R.E. Litz (Eds.). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, CAB International, Wallingford. pp. 35-55.
- Hidajat, J.R., S. Kartaatmadja, dan S.A. Rais. 1999. Teknik produksi benih kacang tanah. Puslitbang Tanaman Pangan, Balitbang Pertanian. Hal. 44, 53.
- Kong, L., S.M. Attree, dan L.C. Fowke. 1998. Effect of polyethylene glycol and methylglyoxal bis(guanylhydrazon) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Sci.* 133: 211-220.
- Leprince O., F.J.M. Harren, J. Buitink, M. Alberda dan F.A. Hoekstra. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration on germinating radicles. *Plant Physiol.* 122:597-568.
- Maluszynski, M., B.S. Ahloowalia, dan B. Sigurbjornsson. 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315.
- Michel, B.E. dan M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 57:914-916.
- Murashige, T. dan F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.



- Nabors, M.W. dan T.A. Dykes. 1985. Tissue culture of cereal cultivar with increased salt, drought and acid tolerance. Di dalam: Proceedings of the Inter-center seminar on International Agricultural Research Center and Biotechnology. Los Banos, Phillipines, 23–27 April 1984.
- Nursusilawati, P. 2003. Respon 16 kultivar kacang tanah unggul nasional (*Arachis hypogaea* L.) terhadap kondisi cekaman kekeringan akibat perlakuan penyiraman PEG 6000 dan evaluasi daya regenerasi ES-nya secara *in vitro*. [Tesis]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Rahayu, E.S., S. Ilyas, H. Aswidinnoor, E. Guhardja dan Sudarsono. 2004. Cekaman oleh PEG dalam media *in vitro* dan penapisan toleransi kacang tanah terhadap kekeringan. Prosiding Seminar Nasional PERIPI. Bogor, 5 – 7 Agustus 2004.
- Rahayu, E.S., S. Ilyas, E. Guhardja dan Sudarsono. 2005. Polietilen glikol (PEG) dalam media *in vitro* menyebabkan kondisi cekaman yang menghambat perkembangan tunas kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.). Berkala Penelitian Hayati (sedang dalam proses review).
- Steuter, A.A. 1981. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol.* 67: 64–67.
- Sudarsono, A. Riduan, dan H. Aswidinnoor. 2004. Toleransi kultivar kacang tanah terhadap cekaman kekeringan pada fase generatif serta kandungan prolin dan gula total daun. *J. Penel. Pert.* 23:50–62.
- Widoretno, W. dan Sudarsono. 2004. Evaluasi sejumlah galur kedelai varian somaklonal hasil seleksi *in vitro* terhadap stres kekeringan. *Hayati* 11:11-20.
- Yusnita, Widodo, dan Sudarsono. 2005. *In vitro* selection of peanut somatic embryos on medium containing culture filtrates of *Sclerotium rolfsii* and plantlet regeneration. *Hayati* 12:50-56.