

Kultur embrio dan penggandaan kromosom hasil persilangan kacang hijau dan kacang hitam

Embryo culture and chromosome doubling of mungbean and black gram hybrid

M. Kosmiatin dan I. Mariska

*Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar Nomor 3A, Bogor 16111, Indonesia*

ABSTRACT

Mungbean development in Indonesia is very low due to complicated good seedling preparation, harvest not the same time, and development of mungbean diseases without varieties tolerant to diseases. Interspecific hybridization is a promising way to get tolerant characters from wild species. Black gram has a good tolerance to diseases but crossing with mungbean often failed caused by incompatible among them. The objectives of the experiment were to cross mungbean and black gram, to rescue the embryo and doubling F1 plant with colchicine to yield F1 amphidiploid. Three black gram varieties (VR-34, VR-35, No. 19/1) were crossed with mungbean (Walet) in the greenhouse. Embryos were harvested at 1, 2, and 3 weeks after pollination. Sterile embryos were cultured in Knudson and modified Knudson media combined with BA 0 and 1 mg/l and MS media with addition of IAA 0.01 mg/l and kinetin 0.1 mg/l. Chromosome doubling was conducted by treated the germinated embryos with 0, 0.05, 0.15, and 0.25% colchicine and incubated for 1, 2, and 3 days. The result showed that using Walet as female parent and black gram VR-35 as male parent produced the highest percentage of successful crossing. The embryos of the crosses could germinate on different media used. Germination of the embryos increased linearly with embryo age and the addition of BA 1 mg/l. Shoots after chromosome doubling could be produced from 0.15% colchicine treatment and incubated for 2 days.

[Keywords: *Vigna radiata*, *V. mungo*, interspecific hybridization, embryo culture]

ABSTRAK

Pengembangan kacang hijau di Indonesia belum maksimal antara lain karena sulitnya petani memperoleh benih yang berkualitas, waktu panen yang tidak serempak, dan berkembangnya penyakit yang tidak diikuti dengan penyediaan varietas tahan penyakit. Persilangan antarspesies memungkinkan untuk mendapatkan sifat ketahanan yang banyak terdapat pada spesies liar. Kacang hitam memiliki ketahanan terhadap berbagai penyakit dan memberikan harapan keberhasilan bila disilangkan dengan kacang hijau. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aksesi kacang hitam yang sesuai untuk disilangkan dengan kacang hijau, umur yang tepat

untuk menyelamatkan embrio, media yang sesuai, serta konsentrasi kolkisin yang dapat menggandakan kromosom F1. Persilangan dilakukan antara kacang hijau sebagai tetua betina dengan tiga aksesi kacang hitam yaitu no. VR-34, VR-35, dan lokal Madura No. 19/1 sebagai tetua jantan. Embrio F1 umur 1, 2, dan 3 minggu dikulturkan pada medium dasar Knudson dan Knudson modifikasi yang ditambah dengan BA 1 mg/l. Sebagai pembanding, embrio dikulturkan pada medium MS yang ditambah dengan IAA 0,01 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l. Penggandaan kromosom dilakukan pada media perkecambah-an yang ditambah kolkisin 0; 0,05; 0,15; dan 0,25% dan diinkubasi selama 1, 2, dan 3 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil persilangan antara kacang hijau varietas Walet dengan kacang hitam nomor aksesi VR-35 menunjukkan hasil terbaik karena dapat berkecambah pada semua media yang digunakan. Perkecambahannya meningkat seiring dengan bertambahnya umur embrio dan penambahan BA 1 mg/l ke dalam media. Tanaman F1 yang diperoleh dari persilangan ini bersifat steril. Penggandaan kromosom ampidiploid diperoleh dengan mengkulturkan embrio pada media dengan penambahan kolkisin 0,15% dan diinkubasi 2 hari.

[Kata kunci: *Vigna radiata*, *V. mungo*, persilangan antarspesies, kultur embrio]

PENDAHULUAN

Kacang hijau (*Vigna radiata* L. Wilczek) termasuk tanaman pangan yang sudah lama dibudidayakan di Indonesia (Arora dan Mauria 1993). Budi daya kacang hijau relatif mudah dengan risiko kegagalan yang kecil. Namun demikian, peningkatan luas pertaniannya hanya sekitar 5%/tahun. Peningkatan yang lambat ini antara lain disebabkan sulitnya petani memperoleh benih yang berkualitas baik serta waktu panen yang tidak serempak (Marzuki dan Soeprapto 2001). Berkembangnya penyakit yang belum diikuti dengan penyediaan varietas tahan juga turut menghambat pengembangan kacang hijau (Astanto dan Sutarman 1993).

Persilangan antarspesies memainkan peran penting dalam program pemuliaan tanaman. Teknik ini diguna-

kan jika keragaman genetik yang diinginkan tidak ditemukan pada spesies yang dibudidayakan. Persilangan antarspesies dapat memfasilitasi introgresi gen antartaksa (Song *et al.* 1997). Persilangan antarspesies juga memungkinkan untuk mendapatkan hibrida dengan variasi yang tinggi, seperti adanya mutasi serta perluasan adaptasi baik terhadap lingkungan abiotik maupun biotik atau memperoleh individu dengan kombinasi karakter yang baru.

Persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam (*Vigna mungo*) telah dilakukan di India dan Australia terutama untuk sifat-sifat toleransi terhadap penyakit. Hasil persilangan menunjukkan keguguran embrio yang cukup tinggi dan kegagalan perkecambahannya (Jaiwal dan Gulati 1995). Benih F1 yang dihasilkan bersifat fertil parsial bahkan steril, lambat matang, dan muncul beberapa sifat morfologi lain yang merupakan perpaduan antara kedua tetuanya (Gosal dan Bajaj 1983).

Untuk menyelamatkan embrio dan meningkatkan daya kecambah biji F1 dapat dilakukan dengan kultur *in vitro*. Teknik ini banyak digunakan untuk menyelamatkan embrio atau biji hasil persilangan dengan cara mengkulturkannya pada media tumbuh yang sesuai (Raghavan 1986). Keberhasilan teknik kultur *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain kondisi dan hubungan kekerabatan genotipe yang digunakan sebagai tetua, formulasi media, dan umur biji muda (embrio) yang dikulturkan.

Persilangan antarspesies umumnya menghasilkan tanaman F1 yang fertil parsial hingga steril penuh/murni, karena genom berasal dari tetua yang berbeda, sehingga ketika pembelahan sel meiosis terjadi pembentukan multivalen (Poespodarsono 1988). Akibatnya gamet yang terbentuk memiliki kromosom yang khimera (Hansen dan Andersen 1998). Tanaman F1 fertil dari persilangan dengan genom yang berbeda dapat diperoleh bila terbentuk amphidiploid atau allotetraploid. Tanaman amphidiploid dapat diperoleh dengan menggandakan genom tanaman F1 dan genom tetua yang akan disilangkan, serta melakukan hibridisasi somatik (fusi protoplas) dari kedua tetua.

Penggandaan kromosom buatan umumnya dilakukan dengan menambahkan senyawa kolkisin. Senyawa ini akan menghambat pembentukan dan aktivitas benang-benang gelendong pada saat mitosis, di mana pada tahap metafase kromosom tidak bergerak ke arah dua kutubnya tetapi tetap berada di daerah ekuator bahkan dapat kembali mengganda (Strickberger 1985). Senyawa kolkisin dapat digunakan baik pada kultur *in vivo* maupun *in vitro*. Efisiensi yang dicapai kedua cara ini relatif sama, namun kultur *in vitro* lebih efektif

karena perlakuannya dapat dikenakan pada tingkat sel (Husni *et al.* 1995).

Penyelamatan embrio dengan kultur embrio dan penggandaan kromosom embrio F1 hasil persilangan diharapkan dapat menghasilkan tanaman amphidiploid yang normal dan fertil. Selanjutnya, tanaman hasil persilangan ini dapat diseleksi dan diuji ketahanannya terhadap penyakit kudis. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aksesori kacang hitam toleran penyakit kudis yang sesuai untuk disilangkan dengan kacang hijau varietas Walet, mengetahui umur yang tepat untuk menyelamatkan embrio dan mencari formulasi media yang sesuai untuk mengecembangkannya, serta mengetahui konsentrasi kolkisin yang dapat menggandakan kromosom F1 hasil persilangan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2002 hingga Mei 2004 di laboratorium kultur jaringan dan kamar kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Bahan tanaman yang digunakan sebagai tetua persilangan adalah kacang hijau varietas Walet sebagai tetua betina serta kacang hitam nomor aksesori VR-34, VR-35, dan lokal Madura No. 19/1 sebagai tetua jantan. Bahan tanaman ditanam di kamar kaca dengan pemupukan sesuai dengan rekomendasi.

Persilangan kacang hijau dan kacang hitam

Persilangan kacang hijau dan kacang hitam dilakukan di kamar kaca. Kastrasi bunga yang akan digunakan sebagai tetua betina dilakukan pada sore hari (pukul 16.00-18.00 WIB) sebelum bunga mekar dan dipilih kuncup bunga yang diperkirakan akan mekar keesokan harinya. Polinasi dilakukan setelah bunga mekar sempurna pada pukul 06.00-08.00 WIB.

Polong dipanen pada umur 1, 2, dan 3 minggu setelah polinasi. Selanjutnya polong disimpan dalam lemari pendingin selama 2 hari sebelum diisolasi.

Pengamatan dilakukan terhadap keberhasilan polinasi, jumlah polong yang terbentuk, dan polong yang gugur. Keberhasilan polinasi dicirikan dengan layunya bunga yang diserbuki dan munculnya bakal polong.

Kultur embrio

Embrio yang akan dikulturkan diisolasi dari polong yang disimpan di dalam lemari pendingin. Sebelum embrio diisolasi, polong disterilkan kemudian embrio diisolasi dengan cara membuka kulit biji. Selanjutnya

embrio ditanam/dikulturkan pada medium perkecambah-an.

Embrio umur 1, 2, dan 3 minggu setelah polinasi di-kulturkan pada medium dasar Knudson dan Knudson yang dimodifikasi (Tabel Lampiran 1) ditambah dengan BA 1 mg/l. Sebagai pembanding, embrio dikulturkan pada medium MS yang ditambah dengan IAA 0,01 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l (Gosal dan Bajaj 1983). Pengamat-an dilakukan terhadap persentase embrio yang ber-kecambah, waktu perkecambahan, serta penampakan kecambah dan biakan *in vitro*.

Penggandaan kromosom

Penggandaan kromosom dilakukan pada embrio muda yang paling baik perkecambahannya. Embrio diganda-kan dengan mengkulturkannya pada medium per-kecambahan dengan menambahkan kolkisin 0; 0,05; 0,15; dan 0,25% kemudian diinkubasi selama 1, 2, dan 3 hari. Embrio yang sudah diperlakukan dengan kolkisin disubkultur pada media pemulihan yaitu media Knudson + BA 1 mg/l yang ditambah dengan arang aktif 0,2%. Pengamatan dilakukan terhadap persentase embrio yang berkecambah dan jumlah kromosom pada jaringan yang diperlakukan dengan kolkisin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam

Keberhasilan persilangan antarspesies sangat di-tentukan oleh kedekatan hubungan kekerabatannya. Hubungan kekerabatan kedua tetua yang makin dekat akan meningkatkan keberhasilan persilangan, sebalik-

nya hubungan yang makin jauh akan memperkecil keberhasilan persilangan.

Penggunaan tiga varietas kacang hitam dimaksud-kan untuk menilai varietas yang paling sesuai di-silangkan secara resiprokal dengan kacang hijau serta menghasilkan biji yang dapat berkecambah sehingga diperoleh tanaman F1 yang fertil. Ketiga aksesi kacang hitam yang digunakan memiliki ketahanan yang cukup tinggi terhadap penyakit kudis.

Keberhasilan persilangan kacang hijau varietas Walet dengan tiga nomor kacang hitam VR-35, VR-34, dan lokal Madura No. 19/1 pada umumnya masih rendah (Tabel 1). Hal ini ditunjukkan oleh persentase polong yang dapat dipanen (umur 3 minggu setelah polinasi) yang hanya 21,7-51,3%.

Persentase keberhasilan polinasi cukup tinggi de-ngan kisaran 72,5-90,0%. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan kacang hijau dan kacang hitam cukup dekat. Hambatan genetik kurang berpengaruh sebelum fertilisasi, tetapi hambatan genetik ini berpe-ngaruh nyata setelah fertilisasi (*postzygotic barriers*). Hal ini ditandai dengan tingginya polong muda yang gugur hingga hari ke-21 setelah polinasi, mencapai 76,5%. Gugur polong terjadi sejak hari pertama hingga 3 minggu setelah polinasi, bahkan polong yang sudah berbiji pun dapat gugur. Pada polong yang gugur, em-brio umumnya kisut sehingga tidak dapat dikulturkan.

Gugurnya polong muda dapat disebabkan oleh in-kompatibilitas setelah fertilisasi, karena endosperma gagal berkembang sehingga tidak dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio. Kegagalan pertumbuhan endosperma dapat disebabkan oleh laju pembelahan sel yang rendah atau bahkan terhenti sehingga mengakibatkan terjadinya degradasi jaring-an endosperma yang sudah terbentuk (Hadley dan

Tabel 1. Rata-rata keberhasilan persilangan antara kacang hijau dan tiga nomor aksesi kacang hitam dari tiga kali ulangan persilangan.

Table 1. Average of succesful hybridization between mungbean and three accesions of black gram in three time hybridization.

Tetua Parental ♀ x ♂	Polinasi Pollination	Polinasi yang berhasil Successful pollination		Polong yang terbentuk Pod formation		Polong gagal Failed pod	
		Jumlah/Number	%	Jumlah/Number	%	Jumlah/Number	%
W x 35	89,7 + 7,77	80,7 + 2,08	90,0 + 4,01	19,0 + 2,00	21,7 + 3,94	61,7 + 2,14	76,5 + 3,71
W x 34	53,3 + 4,04	38,7 + 1,53	72,5 + 1,15	16,7 + 1,15	31,9 + 1,53	22,0 + 1,67	56,9 + 2,03
W x 19/1	108,7 + 9,07	82,0 + 2,65	75,4 + 5,05	55,7 + 3,21	51,3 + 1,55	26,3 + 2,33	32,1 + 2,56

Keterangan: W = Kacang hijau varietas Walet.
35 = Kacang hitam nomor aksesi VR-35.
34 = Kacang hitam nomor aksesi VR-34.
19/1 = Kacang hitam lokal Madura No. 19/1.

Note: W = Walet variety of mungbean.
35 = Accession VR-35 of black gram.
34 = Accession VR-34 of black gram.
19/1 = Accession VR-19/1 of black gram.

Openshaw 1980). Pada kacang-kacangan, pertumbuhan embrio sangat bergantung pada endosperma sebagai sumber nutrisi.

Persentase keberhasilan pembentukan polong tertinggi (51,3%) diperoleh dari persilangan kacang hijau dengan kacang hitam lokal Madura No. 19/1. Polong muda yang gugur juga paling rendah (32,1%) dibandingkan persilangan dengan VR-34 dan VR-35. Penampakan polong hasil persilangan ini kurang baik dibanding persilangan lainnya bahkan jumlah biji kisut pada setiap polong paling banyak.

Kualitas polong yang paling baik dihasilkan dari persilangan Walet dengan VR-35. Polong dapat berbiji dengan jumlah biji kisut hanya sedikit bahkan hampir tidak ada, kualitas bijinya baik dengan kotiledon yang terbentuk sempurna. Namun, persilangan Walet dengan VR-35 sulit dilakukan dengan keberhasilan persilangan hingga terbentuk polong hanya 21,7%, embrio yang gugur cukup tinggi (76,5%), tetapi keberhasilan polinasinya tertinggi (90%).

Pembentukan biji bervariasi dari normal hingga tidak normal (pengisian biji tidak maksimal) sehingga biji kisut atau hanya berisi ovul yang membengkak (tidak dibuahi) yang akhirnya gugur. Warna kulit biji hasil persilangan mengikuti warna kulit biji tua kacang hijau yaitu hijau kecoklatan.

Embrio diisolasi dari polong yang terbentuk dengan mengupas kulit biji, kemudian ditanam pada medium perkecambahan. Embrio yang berhasil diisolasi memiliki kualitas yang beragam, dari normal (embrio dengan endosperma-kotiledon) hingga tidak normal (biji yang tidak memiliki embrio atau biji hampa). Menurut Miyazaki *et al.* (1984), biji hasil persilangan kacang hijau (tua betina) dengan kacang hitam (tua jantan) berbentuk normal hingga tidak normal, kadang biji pecah dengan kotiledon menonjol atau pengisian biji (kotiledon) tidak maksimal sehingga tampak kisut.

Hasil persilangan juga menunjukkan bahwa kacang hijau dan kacang hitam mempunyai hubungan kekerabatan yang relatif dekat karena persilangan dapat menghasilkan F1 yang berkecambah. Namun, tingkat kedekatan tiga aksesori/varietas kacang hitam yang digunakan bervariasi, di mana aksesori VR-35 memiliki hubungan yang paling dekat dengan kacang hijau dibandingkan aksesori VR-34 dan lokal Madura No. 19/1.

Kultur embrio

Pengaruh umur polong setelah polinasi

Pada kultur embrio hasil persilangan antarspesies, umur embrio saat dikulturkan sangat mempengaruhi

keberhasilan persilangan, mengingat embrio yang gugur sangat tinggi dan hal ini tidak dapat diduga sebelumnya. Pada penelitian ini, keguguran polong/embrio berlangsung sejak hari pertama sampai hari ke-21 setelah polinasi. Di lain pihak, penanaman embrio yang masih sangat muda menghadapi kendala teknis sulitnya mengisolasi embrio dari polong karena ukuran embrio sangat kecil. Selain itu, penanaman embrio yang sangat muda memerlukan formulasi media yang lebih kompleks. Penggunaan embrio yang lebih matang akan mempermudah isolasi serta formulasi media yang digunakan lebih sederhana, tetapi embrio yang gugur (embrio tidak berkecambah) akan meningkat.

Pada penelitian ini, embrio dipanen pada umur 1, 2, dan 3 minggu setelah polinasi karena pemasakan embrio kacang hijau berkisar antara 4-6 minggu, sementara kacang hitam 6-9 minggu. Diharapkan sampai umur 3 minggu setelah polinasi, embrio belum gugur tetapi cukup matang untuk berkecambah dan mudah diisolasi.

Semua embrio hasil persilangan kacang hijau dan kacang hitam dapat berkecambah pada media yang digunakan (Tabel 2). Persentase perkecambahan cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya umur embrio yang dikulturkan. Peningkatan umur embrio juga mempercepat waktu perkecambahan karena embrio lebih matang.

Persentase perkecambahan hasil persilangan tiga nomor kacang hitam pada umur embrio yang sama beragam. Persentase perkecambahan terbaik (55,13%) diperoleh dari embrio umur 3 minggu dari tua jantan kacang hitam VR-35, dengan rata-rata waktu perkecambahan 5,4 hari setelah tanam. Perkecambahan hampir tidak terjadi pada embrio umur 3 minggu dengan tua jantan kacang hitam VR-34, dan embrio yang berhasil berkecambah memerlukan waktu 29 hari setelah tanam. Biji hasil persilangan dengan tua jantan VR-34 umumnya memiliki kulit yang pecah karena pertumbuhan kotiledon sangat pesat sehingga menghambat pertumbuhan embrio aksis. Hal ini menunjukkan bahwa embrio dengan kondisi yang tidak sempurna (embrio terhambat oleh kotiledon) memerlukan waktu yang lebih lama untuk berkecambah. Hasil yang sama diperlihatkan oleh embrio umur 1 minggu hasil persilangan dengan kacang hitam VR-35 dan lokal Madura No. 19/1, masing-masing 31,4 dan 30,5 hari.

Persilangan dengan tua jantan kacang hitam VR-35 menghasilkan perkecambahan yang cukup baik pada semua umur embrio dan media yang digunakan. Penggunaan embrio yang makin tua akan meningkatkan persentase embrio berkecambah serta memperpendek waktu perkecambahan. Hal ini sesuai dengan

Tabel 2. Pengaruh umur biji dan formulasi media pada perkecambahan biji hasil persilangan kacang hijau dan kacang hitam dari tiga kali ulangan persilangan.

Table 2. Effect of seed age and media formulation to germination of seed hybrid of mungbean and black gram in three time hybridizations.

Tetua Parental' ♀ x ♂	Umur (minggu) Age (weeks)	Media ²	Jumlah biji dikulturkan Number of cultured seed	Biji berkecambah/ <i>Germinated seed</i>		Rata-rata waktu kecambah (hari) Average of germination time (days)
				Jumlah/Number	%	
W x VR-35	1	KnD	7,33	0,67	8,33	32,5
		KnDB1	7,33	0,67	8,33	34,5
		KnDC	7,33	0,33	5,56	37
		KnDCB1	6	0,33	4,17	34
		MIK	6	1,33	22,22	18,8
Total			34	3,33	9,52	31,4
Total	2	KnD	6,67	0,33	5,56	19
		KnDB1	6,33	2	30,28	15,9
		KnDC	6,67	0,67	11,11	22,4
		KnDCB1	6,33	1,67	26,11	16,5
		MIK	6,67	2,50	30	9,6
Total			32,67	7,17	21,35	16,7
Total	3	KnD	6,67	3	44,44	4,3
		KnDB1	6,33	5,67	90,48	3,6
		KnDC	6,33	1,67	22,02	8,5
		KnDCB1	6,33	3,67	60,71	5
		MIK	6,33	3,67	60,71	5,4
Total			32	17,68	55,13	5,4
W x VR-34	1	KnD	6,33	0,33	4,17	20
		KnDB1	6	2	35,9	23,7
		KnDC	6,67	0	0	0
		KnDCB1	6	4,67	80,95	19,7
		MIK	6	0	0	0
Total			31	7	22,27	21,1
Total	2	KnD	6,33	1,67	26,11	13,2
		KnDB1	6,33	2,67	42,5	12,0
		KnDC	6,33	0,67	12,22	18,5
		KnDCB1	6,67	1	15,87	18,6
		MIK	6,67	1	15,08	15,6
Total			32,33	7,01	22,43	15,6
Total	3	KnD	6,33	0	0	0
		KnDB1	6,33	0	0	0
		KnDC	5,67	0	0	0
		KnDCB1	6	0	0	0
		MIK	6	0,33	5,56	29
Total			30,33	0,33	0,98	29
W x 19	1	KnD	7,33	0,3	4,8	34
		KnDB1	7,33	0	0	0
		KnDC	7,33	0	0	0
		KnDCB1	7,33	0	0	0
		MIK	7	0,7	11,1	27
Total			36,32	1	3,2	30,5

Tabel 2. (Lanjutan).
Table 2. (Continued).

Tetua Parental ¹ ♀ x ♂	Umur (minggu) Age (weeks)	Media ²	Jumlah biji dikulturkan Number of cultured seed	Biji berkecambah/ <i>Germinated seed</i>		Rata-rata waktu kecambah (hari) Average of germination time (days)
				Jumlah/Number	%	
	2	Knd	7	0	0	9
		KndB1	7,33	1	12,5	6
		KndC	7,33	0,3	4,8	11
		KndCB1	7	1	14,5	6,5
		MIK	7	1,3	18,7	12,8
Total			35,66	3,6	13,4	9,1
	3	Knd	6,67	0	12	12
		KndB1	6,67	1	25	10
		KndC	6,33	0,3	12,5	12,5
		KndCB1	6,67	1	54,2	11,5
		MIK	6,33	1,3	30,37	12,5
Total			32,67	3,6	27	11,7

Keterangan: ¹W = kacang hijau varietas Walet; VR-35 = kacang hitam nomor aksesi VR-35; VR-34 = kacang hitam nomor aksesi VR-34; 19 = kacang hitam lokal Madura nomor aksesi 19/1.

²Knd = Knudson; KndB1 = Knudson + BA 1 mg/l; KndC = Knudson modifikasi; KndCB1 = Knudson modifikasi + BA 1 mg/l; MIK = MS + IAA 0,01 mg/l + kinetin 0,1 mg/l.

Note: ¹W = Walet variety of mungbean; VR-35 = accession VR-35 of black gram; VR-34 = accession VR-34 of black gram; 19 = accession VR-19/1 of black gram.

²Knd = Knudson; KndB1 = Knudson + BA 1 mg/l; KndC = modified Knudson; KndCB1 = modified Knudson + BA 1 mg/l; MIK = MS + IAA 0.01 mg/l + kinetin 0.1 mg/l.

Pierik (1987) yang menyatakan bahwa kultur embrio matang lebih sederhana/mudah dibandingkan dengan kultur embrio muda. Pada umur 3 minggu setelah polinasi, kondisi embrio cukup baik dengan kotiledon yang sempurna. Meskipun beberapa embrio memiliki kotiledon yang besar sehingga kulit biji agak merekah, hal itu tidak mengganggu perkecambahan. Dengan kondisi embrio yang hampir sempurna, embrio tidak memerlukan waktu yang lama untuk berkecambah dengan rata-rata waktu kecambah 5,4 hari setelah tanam.

Keberhasilan perkecambahan embrio yang lebih muda hanya 9,52% untuk embrio umur 1 minggu dan 21,35% untuk embrio umur 2 minggu setelah polinasi. Penurunan persentase embrio berkecambah diikuti dengan peningkatan rata-rata waktu berkecambah, yaitu 31,4 hari untuk embrio 1 minggu dan 16,7 hari untuk embrio 2 minggu setelah polinasi. Embrio umur 1 minggu setelah polinasi agak sulit diisolasi karena ukurannya hanya + 2 mm termasuk kulit biji dan embrio masih berupa cairan. Pada umur 2 minggu embrio sudah terlihat, tetapi ukuran kotiledonnya masih kecil. Embrio umur 1 dan 2 minggu setelah polinasi mungkin memerlukan formulasi media yang lebih kaya atau lebih kompleks untuk meningkatkan perkecambahannya.

Pada persilangan dengan tetua jantan kacang hitam VR-34, peningkatan umur embrio justru menurunkan persentase perkecambahan, bahkan pada embrio umur 3 minggu, rata-rata perkecambahan di bawah 1%. Pada umur 3 minggu, kulit biji telah pecah dan kotiledon tumbuh sangat pesat sehingga menghambat pertumbuhan embrio aksis. Hal seperti ini juga terjadi pada persilangan antarspesies *Solanum*, di mana pertumbuhan endosperma hibrida mengguguli pertumbuhan embrio sehingga embrio gugur muda (Handayani 1995). Pada embrio yang lebih muda, pertumbuhan kotiledon belum menghambat pertumbuhan embrio aksis sehingga persentase perkecambahannya 22,27% (embrio 1 minggu) dan 22,43% (embrio 2 minggu). Hal ini menunjukkan bahwa penentuan umur embrio yang akan dikecambahkan harus memperhatikan faktor keguguran embrio dan hubungan kekerabatan tetua yang digunakan. Kultur embrio yang lebih tua relatif lebih mudah dengan formulasi media yang lebih sederhana, tetapi tidak dapat menjamin keberhasilan perkecambahan *in vitro* bagi embrio hasil persilangan.

Pada persilangan dengan tetua jantan kacang hitam lokal Madura No. 19/1, perkecambahan embrio cenderung menyerupai embrio hasil persilangan dengan VR-

35. Namun demikian, pertumbuhan embrio lokal Madura No. 19/1 umur 3 minggu lebih rendah dengan rata-rata waktu berkecambah yang lebih lama dibanding VR-35. Hal ini menunjukkan perkecambahan embrio dari tetua jantan lokal Madura mungkin dapat meningkat bila dikulturkan pada umur yang lebih tua. Rendahnya perkecambahan mungkin juga menunjukkan ketidaksesuaian antara kacang hijau varietas Walet dengan kacang hitam lokal Madura.

Pengaruh media perkecambahan

Pada kultur embrio, keberhasilan perkecambahan *in vitro* juga ditentukan oleh komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media untuk menggantikan peran endosperma. Pengecambahan embrio yang lengkap biasanya tidak memerlukan formulasi media yang rumit, bahkan pada beberapa jenis tanaman, embrio dapat tumbuh pada media dasar tanpa zat pengatur tumbuh, seperti pada embrio hasil persilangan *S. khasianum* dan *S. capsicoides* (Handayani 1995).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam dapat berkecambah pada semua media yang digunakan, baik media yang sederhana (medium dasar Knudson), media yang lebih kaya (MS) maupun media yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh. Secara umum penambahan zat pengatur tumbuh BA pada media dasar dapat meningkatkan persentase perkecambahan. Pada embrio yang lebih muda, penambahan BA 1 mg/l dapat meningkatkan persentase perkecambahan yang lebih baik daripada tanpa penambahan BA. Pada persilangan dengan tetua jantan kacang hitam VR-35, persentase perkecambahan terbaik (90%) diperoleh pada medium Knudson + BA 1 mg/l untuk embrio umur 3 minggu dengan rata-rata waktu berkecambah 3,6 hari. Persentase perkecambahan yang tinggi (81%) juga diperoleh dari embrio umur 1 minggu dari tetua jantan kacang hitam VR-34 yang dikulturkan pada medium Knudson modifikasi + BA 1 mg/l. Namun demikian waktu berkecambahnya jauh lebih lama (19,7 hari).

Media dasar Knudson ternyata cukup baik untuk mengecambahkan embrio hasil persilangan antarspesies, kecuali untuk embrio yang lebih muda dengan tetua jantan VR-35 dan lokal Madura No. 19/1. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Mariska *et al.* (1998) pada embrio hasil persilangan antarspesies panili. Penggunaan medium MS yang diencerkan 1/2 kali lebih baik daripada MS penuh. Kandungan garam

makro media MS yang diencerkan ini hampir sama dengan garam makro media Knudson.

Penambahan BA pada medium perkecambahan juga berhasil pada perkecambahan embrio F1 panili liar dan panili budi daya dengan media 1/2 MS + BA 1 mg/l (Mariska *et al.* 1998), embrio F1 *Vigna unguiculata* dan *V. vexillata* pada media MS + BA 1 mg/l + adenin sulfat + kasein hidrolisat (Gomathinayagami *et al.* 1997), embrio F1 *Glycine max* dan *G. canescens* pada media B5 + BA 1 μ M + NAA 0,1 μ M (Bodanese-Zanettini *et al.* 1996), dan embrio F1 *C. arietinum* dan *C. pinnatifidum* pada media B5 + BA 2 mg/l + IAA (Badami *et al.* 1997). Perkecambahan embrio muda (umur 1 dan 2 minggu) dari tetua jantan kacang hitam VR-35 dan lokal Madura No. 19/1 lebih baik pada medium MS + IAA dan kinetin.

Tunas-tunas yang tumbuh memperlihatkan keragaman yang tinggi (Gambar 1). Tunas tersebut kemudian disubkultur pada media MS atau B5 untuk diperbanyak secara klonal. Namun, tunas-tunas ini tidak dapat mengganda, baik tunas adventif maupun aksilar. Umumnya tunas menunjukkan gejala pembentukan kalus pada pangkal tunas, daunnya gugur dan layu serta akar tidak terbentuk dengan baik. Pelayuan dan gugurnya daun menyebabkan subkultur tunas harus dilakukan dengan cepat, dalam waktu 2 minggu setelah tanam daun mulai layu dan akhirnya gugur. Pelayuan ini juga terjadi pada tunas-tunas pucuk yang disubkultur. Untuk mengurangi daun yang gugur dan layu, dicoba ditambahkan arginin dan glutamin maupun AgNO₃ konsentrasi rendah, namun pertumbuhan tunas justru terhambat dan akhirnya



Gambar 1. Keragaman tunas *in vitro* hasil persilangan antara kacang hijau dengan kacang hitam no aksesori VR-35.

Fig. 1. *In vitro* shoot variation of F1 hybrid of mungbean and accession VR-35 of black gram.

mati. Pembentukan akar dicoba diinduksi dengan menambahkan auksin (IAA, IBA, dan NAA) konsentrasi rendah, tetapi penambahan zat pengatur tumbuh ini justru menginduksi pembentukan kalus. Perbanyakkan klonal pada F1 hasil persilangan kacang hijau dan kacang hitam tidak menambah jumlah tunas, tetapi tunas justru berkurang karena mati akibat pelayuan dan kontaminasi karena seringnya tunas disubkultur.

Tunas-tunas yang berhasil membentuk akar dengan jumlah daun lebih dari dua diaklimatisasi pada medium campuran tanah dan kompos. Namun, plantlet umumnya hanya bertahan hidup sampai 2 minggu, dan beberapa tanaman yang bertahan hidup hingga 12 minggu tidak berbunga. Hal ini menunjukkan hasil persilangan bersifat steril, karena ketidakcocokan kromosom antartetua sehingga kromosom tidak berpasangan.

Penggandaan kromosom

Salah satu upaya untuk mengatasi sterilitas hasil persilangan adalah dengan menggandakan kromosom secara buatan sedini mungkin. Penggandaan pada tahap dini dimaksudkan untuk meningkatkan peluang mendapatkan tanaman ampiploid (Poespodarsono 1988). Penggandaan kromosom secara *in vitro* dapat dilakukan pada bahan tanaman yang masih sangat muda, bahkan pada tingkat sel (Husni *et al.* 1995).

Pada penggandaan kromosom secara *in vitro*, embrio hasil persilangan antara kacang hijau dan kacang hitam VR-35 memberikan persentase perkecambahan tertinggi. Penggandaan dilakukan dengan mengkulturkan embrio umur 2-3 minggu pada medium perkecambahan yang ditambah dengan kolkisin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio gagal berkecambah untuk setiap ulangan penggandaan. Embrio tidak mati, tetapi plumula gagal membentuk tunas sementara radikel tidak memanjang tetapi hanya mengalami pembengkakan. Daun pertama dapat tumbuh dan berwarna hijau tetapi hanya bertahan beberapa hari kemudian gugur. Kotiledon dan radikel membesar lalu membentuk kalus, tetapi kalus tidak dapat beregenerasi. Masalah pengkalusan ini sulit diatasi meskipun sudah dicoba dengan menambahkan antiauksin ke dalam medium. Pada beberapa perlakuan, kalus yang terbentuk menyerupai kalus embriogenik, tetapi kalus ini sulit beregenerasi membentuk benih somatik atau bila berhasil benih somatik yang terbentuk tidak sempurna.

Analisis kromosom dengan metode *squash* sulit dilakukan karena kalus tumbuh menutupi titik-titik tumbuh, baik meristem tunas maupun ujung akar.

Jumlah kromosom kalus tidak dapat dianalisis karena sulitnya menentukan tahap metafase sel akibat pembelahan sel kalus yang sangat aktif dan cepat.

Penggandaan embrio diulang dengan mengganti media pemulihan setelah perlakuan kolkisin. Pemulihan dilakukan dengan mengkulturkan embrio pada media perkecambahan yang diberi arang aktif 0,2% untuk mengurangi residu kolkisin yang terbawa. Arang aktif dapat mengikat toksin yang dikeluarkan oleh eksplan. Subkultur ini berhasil mengurangi pengkalusan bahkan beberapa tunas dapat tumbuh (Gambar 2). Tunas berhasil diperoleh dari semua konsentrasi perlakuan kolkisin 0,05; 0,15; dan 0,25% dan diinkubasi selama 2 hari (Tabel 3). Tunas terbanyak diperoleh dari konsentrasi kolkisin 0,15%.

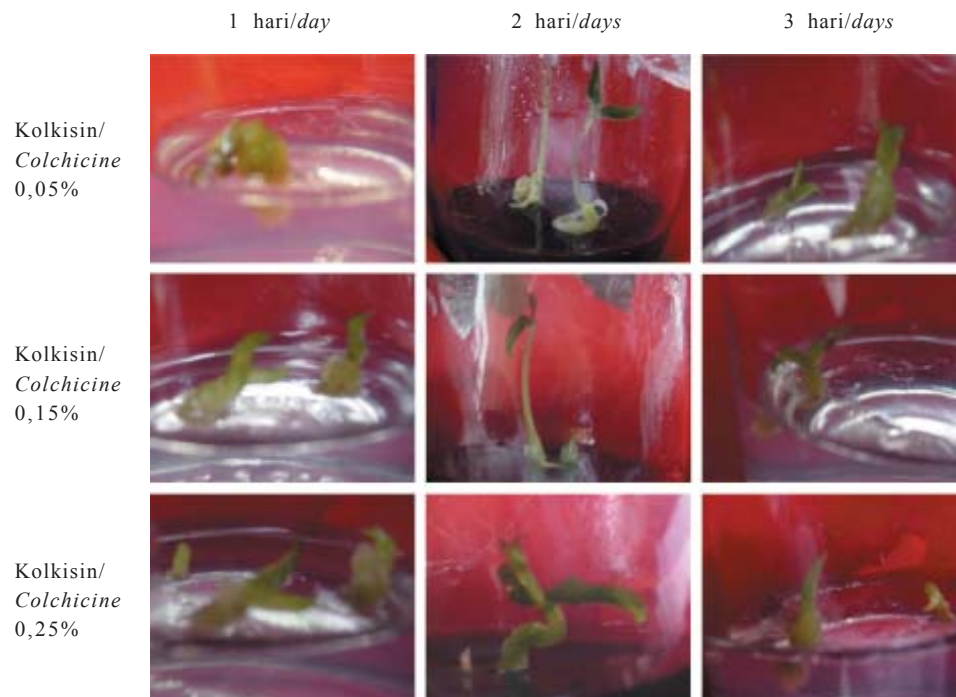
Analisis kromosom dilakukan dengan memperingkat perendaman dalam larutan hidroksikuinolin menjadi hanya 2 jam. Semua eksplan yang hidup dianalisis jumlah kromosomnya. Tanaman hasil persilangan antarspesies biasanya steril akibat ketidakseimbangan kromosom ketika terjadi pembelahan. Pada saat mitosis sering terjadi pergerakan kromosom yang multivalen sehingga terbentuk sel-sel khimera dengan jumlah kromosom homolog sedikit atau tidak ada sama sekali. Hambatan ini dapat diatasi dengan menggandakan kromosom secara buatan seperti dengan perlakuan kolkisin.

Hasil analisis menunjukkan adanya keragaman jumlah kromosom dari eksplan yang berhasil difiksasi pada tahap metafase, meskipun dengan perlakuan kolkisin yang sama (Tabel 3). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jumlah kromosom dari embrio F1 yang digandakan.

Tingkat ploidi kromosom tidak dapat diketahui karena embrio langsung digandakan tanpa dilihat terlebih dahulu jumlah kromosom awalnya. Jumlah kromosom awal sulit diperoleh karena biakan tidak dapat diperbanyak secara klonal. Perlakuan kolkisin 0,25% memberikan jumlah kromosom terbanyak (72). Perlakuan kolkisin yang lebih lama juga meningkatkan jumlah kromosom. Tunas yang diperoleh berasal dari biakan dengan jumlah kromosom 36-60.

KESIMPULAN

Tetua kacang hitam VR-35 paling sesuai untuk disilangkan dengan kacang hijau dengan hasil persilangan F1 yang paling baik. Embrio dapat berkecambah sampai umur embrio 3 minggu setelah polinasi, kecuali pada persilangan dengan kacang hitam VR-34. Perkecambahan embrio secara *in vitro*



Gambar 2. Pengandaan kromosom secara *in vitro* dengan kolkisin pada embrio F1 hasil persilangan kacang hijau dan kacang hitam.
Fig. 2. In vitro chromosome doubling of F1 hybrid of mungbean and black gram with colchicine.

Tabel 3. Pengandaan kromosom secara *in vitro* pada embrio hasil persilangan antara kacang hijau (tetua betina) dan kacang hitam (tetua jantan).

Table 3. In vitro chromosome doubling of embryo hybrid of mungbean and black gram.

Kolkisin/ Colchicine (%)	Lama inkubasi (hari) Incubation period (day)	Jumlah embrio dikultur Number of embryo cultured	Embrio membentuk tunas Shoot formation from embryo (%)	Embrio mengkalus Callus formation from embryo (%)	Rata-rata jumlah kromosom Average of chromosom number		
					1	2	3
					0,05	1	8
	2	9	22,2 (2/9)	22,2 (2/9)	54	36	38
	3	8	0	50,0 (4/8)	60	56	48
0,15	1	8	0	75,0 (6/8)	54	36	34
	2	9	44,4 (4/9)	22,2 (2/9)	40	54	60
	3	8	0	62,5 (5/8)	36	48	50
0,25	1	10	0	60,0 (6/10)	50	60	72
	2	10	10,0 (1/10)	70,0 (7/10)	-	-	-
	3	8	0	62,5 (37,5)	72	60	54

Keterangan: - tidak jelas/Note: - unclear.

dapat dilakukan pada medium dasar Knudson. Penambahan BA 1 mg/l dapat meningkatkan persentase embrio berkecambah. Tunas terbanyak diperoleh dari perlakuan kolkisin 0,15% dan diinkubasi 2 hari. Jumlah kromosom terbanyak diperoleh dari konsentrasi kolkisin 0,25%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. G.A. Wattimena, M.Sc. atas bimbingannya sehingga penelitian ini selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Arora, R.K. dan S.S. Mauria. 1993. *Vigna radiata*. hlm. 88-94. Dalam Van der Maesen and S. Sumaatmadja (Ed.). Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara, Kacang-kacangan. Gramedia, Jakarta.
- Astanto, K. dan T. Sutarman. 1993. Perbaikan genetik kacang hijau untuk stabilitas hasil. Dalam Kacang Hijau. Edisi Khusus Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang. hlm. 25-49.
- Badami, P.S., N. Mallikarjuna, and J.P. Moss. 1997. Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. Plant Breed. 116: 393-395.
- Bodanese-Zanettini, M.H., M.S. Lauxen, S.N.C. Richter, S. Cavali-Molina, C.E. Lange, P.J. Wang, and C.Y. Hu. 1996. Wide hybridization between Brazilian soybean cultivars and wild perennial relatives. Theor. Appl. Genet. 93: 703-709.
- Gomathinayagami, P., S. Ganeshram, R. Rathnaswamy, and N.M. Ramaswamy. 1997. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. Euphytica 102: 203-209.
- Gosal, S.S. and Y.P.S. Bajaj. 1983. Interspecific hybridization between *V. mungo* and *V. radiata* through embryo culture. Euphytica 32: 129-137.
- Hadley, H.H. and S.J. Openshaw. 1980. Interspecific and intergeneric hybridization. p. 133-159. In W.R. Fehr and H.H. Hadley (Eds). Hybridization of Crop Plant. ASA and SCCA, Madison, New York.
- Handayani, T. 1995. Persilangan Antarjenis *Solanum khasianum* CLARKE dan *Solanum capsicoides* ALL dengan Penyelamatan Embrio dan Perlakuan Kolkisin. Tesis Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Hansen, N.J.P. and S.B. Andersen. 1998. *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) Euphytica 102: 101-108.
- Husni, A., D. Sukmadjaja, dan I. Mariska. 1995. Variasi somaklonal tanaman panili dengan mutagen kimia colchicines secara *in vitro*. hlm. 8-16. Prosiding Evaluasi dan Hasil Penelitian Tanaman Industri. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Bogor.
- Jaiwal, P.K. and A. Gulati. 1995. Current status and future strategies of *in vitro* culture techniques for genetic improvement of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Euphytica 86: 167-181.
- Mariska, I., Hobir, A. Husni, M. Kosmiatin, dan Y. Rusyadi. 1998. Penyelamatan embrio hasil persilangan antara panili budi daya dan panili liar serta sistem regenerasinya. Laporan Hasil Penelitian. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor.
- Marzuki, R. dan H.S. Soeprapto. 2001. Bertanam Kacang Hijau. Penebar Swadaya, Depok. 55 hlm.
- Miyazaki, S., J. Kawakami, and N. Ishikura. 1984. Phylogenetic relationship classification of *Vigna radiata* - *mungo* complex. JARQ 17(4): 225-229.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht Boston Lancaster. p. 344.
- Poespodarsono, S. 1988. Dasar-Dasar Pemuliaan Tanaman. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor-Lembaga Sumberdaya Informasi, Institut Pertanian Bogor.
- Raghavan, V. 1986. Variability through wide crosses and embryo rescue. p. 631-633. In I.K. Vasil (Ed.). Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plant. Vol. 3. Academic Press Inc., New York.
- Song, P., W. Kang, and E.B. Peffley. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F1 hybrids through colchicines treatment of regenerating callus. Euphytica 93: 257-262.
- Strickberger. 1985. Genetics. 3rd Ed. Macmillan Publishing Company, New York, Collier Macmillan Publishers, London. 842 pp.

Tabel Lampiran 1. Komposisi hara makro dan mikro media MS, Knudson dan Knudson modifikasi.

Appendix Table 1. Composition of MS, Knudson, and modified Knudson media.

Hara	MS	Knudson	Knudson modifikasi
Garam makro (mg/l)			
<i>Macro-element</i>			
NH ₄ NO ₃	1.650	-	-
KNO ₃	1.900	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	-	500	500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	1.000	1.000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	250
KH ₂ PO ₄	170	-	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	-	-
Garam mikro (mg/l)			
<i>Micro-element</i>			
H ₃ BO ₃	6,2	0,056	0,056
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	57	57
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	0,033	0,033
KI	0,83	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,024	0,024
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,040	0,040
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	25	25
Na-EDTA	37,3	-	-
Fe-EDTA	-	-	-
Vitamin dan komponen lainnya (mg/l)			
<i>Vitamins and other</i>			
Meso-inositol	100	-	-
Asam nikotinat	0,5	-	-
Piridoxin-HCl (B6)	0,5	-	-
Thiamin (B1)	0,1	-	-
Nikotinamida	-	-	-
Ca-panthotenat	-	-	-
Gula	30	30	30
Agar	8	8	8
pH	5,8	5,8	5,8