

REGENERASI TUNAS DARI KALUS YANG TELAH DIBERI PERLAKUAN IRADIASI PADA PADI VARIETAS FATMAWATI* [Shoot Regeneration of the Fatmawati Rice Variant Radiated Callie]

Rossa Yunita[✉], Endang G Lestari dan Iswari S Dewi

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Telepon (0251) 339793, 337975 Fak. (0251) 338820
e-mail : rossa_yunita@yahoo.com

ABSTRACT

Gamma ray mutative induction for increasing genetic variation has been applied for plant prime variety engineering. The materials are derived from seed organ, shoot and calli. Calli is a group of actively dividing cell and have not been organized to form plant. The benefit of using calli explant is that the gamma ray could directly shot to DNA in the nuclear cell in such a way that there is higher opportunity for genetic change to occur. The problema of using calli explant are the difficulties in regenerating the calli into shoots, due to the deformation as a result of radiation process. Therefore, this research is aimed at obtaining the appropriate media formulation for shoot regeneration from Fatmawati-rice calli which has been irradiated with gamma ray. The reseach was conducted in BB-Biogen laboratory consisting of three experiments, such as : (1) calli irradiation with the dosage of 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55 and 60 Gy, (2) shoot regeneration at the MS + BA (0, 1, dan 3 mg/l) + IAA (0 dan 0,8 mg/l) media, and BA (0, 1, and 3 mg/l) + zeatin (0; 0,1; 0,2 and 0,3 mg/l) + IAA 0,8 mg/l and (3) Shoot induction at MS + IBA (0, 1, 2 and 3 mg/l) media. The result shows that the range of LD₅₀ was obtained at the dosage of 30 Gy, the most appropriate media for shoot regeneration is MS + BA 3 mg/l + IAA 0,8 + zeatin 0,1 mg/l and media for root induction is IBA 1 mg/l.

Key words: Fatmawati rice variant, calli, gamma ray, plant regeneration, *in vitro*.

ABSTRAK

Induksi mutasi menggunakan iradiasi sinar gamma untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman telah diaplikasikan dalam perakitan varietas unggul. Bahan yang dapat digunakan antara lain organ biji, tunas pucuk atau kalus. Yang dimaksud kalus adalah sekelompok sel yang masih aktif membelah dan belum terorganisasi membentuk organ. Keuntungan menggunakan eksplan kalus antara lain sinar gamma yang diberikan dapat langsung mengenai DNA di dalam inti sel sehingga peluang terjadinya perubahan genetik menjadi lebih tinggi. Masalah yang sering dijumpai dalam penggunaan eksplan kalus adalah sulitnya kalus tersebut diregenerasikan membentuk tunas, karena adanya kerusakan akibat terkena sinar radiasi. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan formulasi media yang tepat untuk meregenerasikan tunas dari kalus padi Fatmawati yang telah di beri perlakuan iradiasi sinar gamma. Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Sel dan Jaringan BB-Biogen, terdiri dari tiga percobaan, yaitu: (1) iradiasi kalus dengan dosis 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55 dan 60 Gy, (2) regenerasi tunas pada media MS + BA (0, 1, dan 3 mg/l) + IAA (0 dan 0,8 mg/l), dan BA (0, 1, dan 3 mg/l) + zeatin (0; 0,1; 0,2 dan 0,3 mg/l) + IAA 0,8 mg/l dan (3) Induksi akar pada media MS + IBA (0, 1, 2 dan 3 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kisaran LD₅₀ diperoleh pada dosis 30 Gy, media untuk regenerasi tunas yang tepat adalah MS + BA 3 mg/l + IAA 0,8 + zeatin 0,1 mg/l dan media untuk induksi akar adalah IBA 1 mg/l.

Kata kunci: Padi var Fatmawati, kalus, sinar gamma, regenerasi tanaman, *in vitro*.

PENDAHULUAN

Penggunaan iradiasi sinar gamma dalam aspek pemuliaan tanaman sangat besar manfaatnya dalam perakitan varietas unggul atau klon baru. Sejak tahun 1985 telah dilepas sebanyak 64% dari 1.585 varietas berasal dari perlakuan iradiasi sinar gamma (Maluszynski *et al.*, 1995). Perbaikan genetik pada tanaman padi sawah dengan teknik mutasi telah dilakukan di BATAN dan telah berhasil dilepas beberapa varietas baru pada tanaman padi antara lain: Atomita 1, Atomita 2, Atomita 3, Atomita 4, Situgintung, Cilosari, Woyla, Meraoke, Kahayan, Winongo, Diah Suci, Yuwono dan Mayang

(Soeranto, 2003).

Keberhasilan teknik iradiasi untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman ditentukan oleh radiosensitivitas material yang diberi perlakuan iradiasi. Tingkat sensitivitas tanaman sangat bervariasi antar jenis tanaman dan antar genotipe (Banerji and Datta 1992). Radiosensitivitas dapat di ukur berdasarkan nilai LD₅₀ yaitu dosis yang menyebabkan kematian 50% bahan yang diberi perlakuan iradiasi. Beberapa hasil studi menunjukkan bahwa dosis optimum yang dapat menghasilkan mutan terbanyak biasanya berada di level LD₅₀ dan untuk masing-masing tanaman

*Diterima: 16 Agustus 2012 - Disetujui: 8 September 2012

memiliki nilai yang berbeda. Pada eksplan kalus tanaman gandum LD₅₀ sinar gamma adalah berkisar 50 Gy (Purnamaningsih, 2011). Nilai LD₅₀ sinar gamma untuk tunas pisang Raja bulu adalah 10 Gy (Lestari *et al.*, 2009). Radiosentivitas dapat diamati dengan adanya letalitas, mutasi somatik, perubahan jumlah dan ukuran kromosom (Datta 2001).

Pembentukan varian baru melalui iradiasi sinar gamma dapat dilakukan pada sekelompok sel seperti kalus, serta bagian jaringan tanaman seperti daun dan batang. Iradiasi pada tingkat kalus menghasilkan frekuensi varian yang lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan jaringan tanaman, karena pada tingkat kalus sel-selnya masih bersifat meristematik sehingga lebih responsif terhadap radioaktif.

Masalah dalam aplikasi metoda induksi mutasi menggunakan eksplan kalus adalah sulitnya meregenerasikan masa sel (kalus) yang telah diberi perlakuan iradiasi, karena sebagian dari sel-sel tersebut mengalami kerusakan. Lestari dan Yunita (2008) mendapatkan formulasi media untuk regenerasi kalus padi varietas *Fatmawati* yaitu MS + BA 2 mg/l + IAA 0,8 mg/l + zeatin 0,2 mg/l, akan tetapi formulasi ini tidak memberikan hasil yang optimum bila diaplikasikan pada kalus yang telah diradiasi sinar gamma. Hal ini terlihat dari hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan dimana persentase regenerasi kalus yang telah di regenerasi sangat kecil yaitu sebanyak 2%. Kemampuan kalus beregenerasi dapat ditingkatkan menggunakan media dengan penambahan sitokinin dan auksin atau menggunakan eksplan kalus yang ukurannya masih kecil dan belum mengalami periode sub kultur.

Keberhasilan regenerasi tunas dari kalus ditentukan oleh banyak faktor di antaranya komposisi zat pengatur tumbuh yang digunakan di dalam media kultur, kondisi fisiologi kalus, kondisi lingkungan tumbuh seperti temperatur ruangan, cahaya serta kelembaban ruangan (Lestari, 2008). Pembentukan tunas dapat dipacu dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin (Gaba, 2005). Beberapa jenis sitokinin yang umum digunakan dalam meregenerasikan kalus pada tanaman padi adalah

BAP, kinetin dan zeatin (Lestari, 2005). Namun setiap genotipe atau jaringan mempunyai respons yang berbeda dalam penyerapan zat pengatur tumbuh dalam medium dan memiliki kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang berbeda.

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan formulasi media regenerasi tunas dari eksplan kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi sinar gamma

BAHAN DAN METODA

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Sel dan Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan sumberdaya Genetik-Biogen, terdiri atas tiga percobaan (1) iradiasi kalus dengan sinar gamma (2) regenerasi tunas dari kalus yang telah diiradiasi dan (3) induksi akar dari tunas.

Bahan tanaman yang digunakan untuk induksi kalus adalah embrio zigotik dari benih padi varietas *Fatmawati*. Biji dikupas kulitnya kemudian disterilisasi berturut-turut menggunakan larutan (1) alkohol 70% selama 5 menit, (2) Bayclin (NaOCl 5,25%) 30% selama 10 menit (3) Bayclin (NaOCl 5,25%) 20% selama 12 menit kemudian dibilas menggunakan akuades steril tiga kali. Selanjutnya diisolasi embrionya kemudian ditanam pada media untuk induksi kalus sebanyak 20 eksplan per botol.

Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media dasar MS + vitamin B (piridoksin HCl 0,5 mg/l; asam nikotinat 0,1 mg/l; thiamin 0,1 mg/l; myo inositol 100 mg/l dan glisin 2 mg/l). Media dipadatkan dengan phytigel 3 g/l dengan sumber sukrosa 30 g/l. Zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk induksi kalus adalah 2,4-D 3 mg/l + kasein hidrolisat (CH) 3 g/l. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 kg/cm² selama 15 menit. Kultur diinkubasi di ruang gelap pada suhu 25 ± 2°C.

Induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma

Kalus dengan diameter 2-5 mm disubkultur pada media tanpa zat pengatur tumbuh dalam cawan petri kemudian diiradiasi dengan sinar gamma pada

dosis 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50, 60 Gy, menggunakan bahan aktif Co^{60} pada iradiator Gamma Chamber 4000A. Kemudian dipindahkan pada media untuk induksi kalus yaitu MS +2,4-D 3 mg/l + CH 3 g/l. Peubah yang diamati adalah persentase kalus yang mati (menghitam).

Regenerasi kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi

Kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi dengan sinar gamma pada dosis sekitar LD₅₀ dikulturkan pada media regenerasi tunas. Media untuk regenerasi tunas adalah media dasar MS + vitamin B ditambah zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin yaitu BA (0, 1, 2, 3 mg/l) + IAA (0 dan 0,8 mg/l) dan BA (0, 1, 2 dan 3 mg/l) + zeatin (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/l) + IAA 0, 8 mg/l. Sebagai pematid media digunakan phytigel 3 g/l dan sebagai sumber energi digunakan sukrosa 30 g/l. Masing-masing botol ditanami empat kalus dan masing-masing perlakuan terdiri 10 botol. Kultur disimpan di ruangan kultur dalam kondisi gelap selama 16 jam dengan suhu ruang 25°C. Peubah yang diamati adalah persentase pembentukan spot hijau, persentase kalus berwarna hitam (mati) dan persentase kalus yang bertunas. Rancangan percobaan adalah acak lengkap.

Tabel 1. Komposisi hara Yoshida

Unsur	Nama Bahan	mg/liter
N	NH_4NO_3	91,4
P	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40,3
K	K_2SO_4	71,4
Ca	CaCl_2	88,6
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	32,4
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,5
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,074
B	H_3BO_3	0,934
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,035
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,031
Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7,7
	Citric Acid (monohydrat)	11,9

Pengakaran tunas dan aklimatisasi

Media untuk induksi akar adalah MS + IBA (1, 2 dan 3 mg/l). Kultur disimpan didalam rak kultur dengan penerangan lampu fluoresens selama 16 jam terang dan 8 jam gelap, suhu ruang diatur dalam kisaran 25°C. Peubah yang diamati adalah persentase tunas membentuk akar dan panjang akar. Rancangan percobaan adalah acak lengkap dengan 10 ulangan.

Aklimatisasi dilakukan dengan merendam plantlet di dalam larutan Yoshida (Tabel 1) selama satu minggu. Setelah panjang akar mencapai 10 – 15 m kemudian dipindahkan ke dalam ember berisi campuran tanah dan pupuk kandang.

HASIL

Iradiasi kalus dengan sinar gamma

Persentase kalus yang mati tergantung pada dosis iradiasi sinar gamma yang digunakan. Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada dosis sinar gamma 50 -60 Gy menyebabkan sebagian atau seluruh kalus mengalami pencoklatan dan mati, semakin tinggi dosis yang diberikan maka persentase kalus yang mati menjadi lebih tinggi. Kalus yang mati ditandai dengan warna kalus yang berubah menjadi cokelat dan menghitam.

Tabel 2. Pengaruh dosis iradiasi sinar gamma terhadap persentase kalus yang mati, 15 hari setelah tanam

Dosis iradiasi (Gy)	Persentase kalus yang mati (%)
0	0
5	25
10	35,5
15	37,5
20	40
25	47,5
30	50
35	62,5
40	67,5
45	75
50	90
60	100

Tabel 3. Pertumbuhan kalus pada media regenerasi tunas, minggu ke-6 setelah tanam

Perlakuan media (mg/l)	Persen kalus berwarna kuning + spot hijau	Persen Kalus berwarna hitam (mati)	Persen kalus bertunas
BA 0	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
1	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
2	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
3	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
BA 0 + IAA 0,8	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
1 + 0,8	0 (0/40)	100 (40/40)	0 a
2 + 0,8	5 (2/40)	95 (38/40)	0 a
3 + 0,8	12,5 (5/40)	87,5 (35/40)	0 a

Keterangan: angka-angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata 5% menurut uji beda nyata jujur (BNJ)

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa dosis sinar gamma yang menyebabkan 50% kalus padi mengalami kematian atau yang dikenal dengan LD₅₀ berkisar pada dosis 30 Gy.

Regenerasi tunas dari kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi sinar gamma.

Pertumbuhan tunas dari kalus yang telah diberi perlakuan radiasi serta pertumbuhan kalus dapat dilihat pada Tabel 3.

Kalus yang ditanam pada media regenerasi dengan penambahan zat pengatur tumbuh BA (0, 1, 2 dan 3 mg/l) dan IAA 0,8 mg/l tidak menghasilkan tunas, untuk itu dicoba media dengan menambahkan zat pengatur tumbuh zeatin sebesar 0,1, 0,2 dan 0,3 mg/l. Pada media tersebut kalus yang diregenerasikan dapat menghasilkan tunas namun persentase kalus bertunas masih rendah, pada media dengan penambahan BA 2 mg/l + zeatin 0,2 mg/l menghasilkan kalus bertunas sebesar 22,5% dan pada media dengan BA 1 mg/l + zeatin 0,2 mg/l, kalus yang bertunas sebesar 12,5% (Tabel 4) pada perlakuan tersebut persentase kalus yang bertunas paling tinggi. Sedangkan kalus yang ditanam pada media dengan pemberian BA konsentrasi 2- 3 mg/l dan zeatin 0,3 mg/l tampak tidak menghasilkan tunas, tunas dihasilkan dari perlakuan BA 1 mg/l + zeatin 0,3 mg/l tetapi hanya 7,5%.

Induksi akar dari tunas

Hasil analisis statistik terhadap panjang akar menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan IBA dengan tanpa IBA. Penggunaan IBA 1 sampai dengan 3 mg/l memberikan hasil yang sama terhadap panjang akar. Tunas yang berakar pada media tanpa IBA hanya 20%, sedangkan pada media dengan IBA 1-3 mg/l mampu menginduksi akar sebesar 100%.

PEMBAHASAN

Iradiasi pada kalus padi var *Fatmawati* dengan dosis di atas 40 Gy sudah menghambat pertumbuhan, pada dosis tersebut kalus yang mati ditandai perubahan warna menjadi coklat dan hitam sebesar 67,5 % (Tabel 2). Semakin tinggi dosis yang diberikan maka tingkat kematian lebih tinggi karena kerusakan pada sel meristem yang sangat radio sensitif. Iradiasi dapat menyebabkan pembelahan sel menjadi terhambat yang selanjutnya mempengaruhi pertumbuhan jumlah sel. Sebagian besar jaringan mengandung air, sehingga saat diberi perlakuan iradiasi akan mengalami kerusakan karena iradiasi menyebabkan air terurai menjadi H₂O dan e⁺ (Ismachin, 1988).

Pada dosis iradiasi 30 Gy, persentase kalus yang mati berkisar 50%, sehingga dosis tersebut dianggap sebagai LD₅₀. Dengan demikian level tersebut akan di digunakan sebagai dosis yang

optimal untuk meningkatkan keragaman. Banyak faktor yang mempengaruhi respon kalus terhadap perlakuan iradiasi, baik itu secara fisik maupun faktor biologis. Secara fisik, bentuk dan ukuran dapat mempengaruhi fisik sel saat menerima iradiasi sinar gamma, selain itu faktor biologis seperti genetik dan juga faktor lingkungan seperti oksigen, kadar air, penyimpanan pasca iradiasi dan suhu. Semakin banyak kadar oksigen dan molekul air (H_2O) berada dalam materi yang diiradiasi, maka makin banyak pula radikal bebas yang terbentuk sehingga menjadi semakin sensitif (Herison *et al.* 2008).

Pada minggu ke-4 setelah tanam, sebagian dari kalus yang diregenerasikan pada media dengan penambahan BA 2 dan 3 mg/l + IAA 0,8 mg/l berubah menjadi kuning keputihan dan membentuk spot-spot berwarna hijau sebesar 5 dan 12,5 % , spot hijau tersebut merupakan bakal tunas. Apabila komposisi media di dalam media maupun didalam jaringan tanaman sudah tepat maka spot hijau tersebut akan berkembang menjadi tunas. Namun demikian dalam perlakuan ini kombinasi BA 2 dan 3 mg/l + IAA 0,8 mg/l tidak diperoleh tunas seperti yang diharapkan, pada media tersebut spot yang semula berwarna hijau berubah menjadi coklat dan

hitam. Hal yang sama juga terjadi pada tanaman padi glutinous varietas TDK1, pemberian BA dan IAA pada konsentrasi tertentu tidak mampu meregenerasikan tunas dari eksplan kalus. Regenerasi tunas dari eksplan kalus sangat dipengaruhi oleh perbandingan sitokinin dan auksin pada media (Lestari 2011).

Pemberian zat pengatur tumbuh zeatin 0,1 s/d 0,3 mg/l dikombinasikan dengan BA 0 s/d 3 mg/l ternyata tidak memberikan hasil yang optimal. Tabel 4 menunjukkan bahwa penambahan zeatin 0,1 mg/l pada media yang sudah mengandung BA 3 mg/l dapat menghasilkan tunas namun persentasenya masih rendah yaitu 7,25% namun demikian zat pengatur tumbuh zeatin yang digunakan tampak memberikan respon lebih baik dibandingkan perlakuan tanpa zeatin. Persentase kalus bertunas tertinggi yaitu 25 dan 22,5 % dihasilkan dari perlakuan BA 2 mg/l + zeatin 0,1 dan 0,2 mg/l yaitu. Zeatin merupakan zat pengatur tumbuh alami tergolong sitokinin biasa dikombinasikan dengan sitokinin lain seperti BA atau dengan auksin seperti IAA untuk meningkatkan proliferasi tunas contohnya pada induksi multiplikasi tunas tanaman belimbing dewi menggunakan IAA 0,5 mg/l dan zeatin 0,2 mg/l

Tabel 4. Pertumbuhan tunas pada media regenerasi BA dan zeatin, minggu ke-6 setelah tanam

Perlakuan media (mg/l)	Kalus berwarna kuning + spot hijau (%)	Kalus berwarna hitam (mati) (%)	Kalus bertunas (%)
BA 0 + zeatin 0,1	0 (0/40)	100 (40/40)	0 e
1 + 0,1	25 (10/40)	75 (30/40)	0 e
2 + 0,1	37,5 (15/40)	62,5 (25/40)	2,5 d
3 + 0,1	42,5 (17/40)	57,5 (23/40)	7,5 c
BA 0 + zeatin 0,2	0 (0/40)	100 (40/40)	0 e
1 + 0,2	25 (10/40)	75 (30/40)	12 b
2 + 0,2	37,5 (15/40)	62,5 (25/40)	22,5 a
3 + 0,2	45 (18/40)	55 (22/40)	22,5 a
BA 0 + zeatin 0,3	0 (0/40)	100 (40/40)	0 e
1 + 0,3	25 (10/40)	75 (30/40)	7,5 c
2 + 0,3	37,5 (15/40)	62,5 (25/40)	0 e
3 + 0,3	42,5 (17/40)	57,5 (23/40)	0 e

Keterangan: angka-angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata 5% menurut uji beda nyata jujur (BNJ)

Tabel 5. Pertumbuhan kalus pada media regenerasi dengan pemberian BA, zeatin dan IAA 0,8 mg/l, pada minggu ke-6 setelah tanam

Media perlakuan (mg/l) Sudah mengandung IAA 0,8 mg/l	Persen Kalus berwarna kuning + spot hijau	Persen Kalus berwarna hitam (mati)	Persen Kalus bertunas
BA 0 + zea 0,1	12,5 (5/40)	87,5 (35/40)	0 e
1 + 0,1	45 (18/40)	55 (22/40)	25 bc
2 + 0,1	87,5 (35/40)	52,5 (21/40)	30 b
3 + 0,1	87,5 (35/40)	12,5 (5/40)	50 a
BA 0 + zea 0,2	17,5 (7/40)	82,5 (33/40)	0 e
1 + 0,2	75 (30/40)	25 (10/40)	25 bc
2 + 0,2	87,5 (35/40)	12,5 (5/40)	25 bc
3 + 0,2	87,5 (35/40)	12,5 (5/40)	30 b
BA 0 + zea 0,3	12,5 (5 /40)	87,5 (35/40)	0 e
1 + 0,3	57,5 (23/40)	42,5 (27/40)	25 bc
2 + 0,3	72,5 (29/40)	27,5 (11/40)	17,5 cd
3 + 0,3	87,5 (35/40)	12,5 (5/40)	12,5 d

Tabel 6. Persentase tunas menghasilkan akar dan rata-rata panjang akar, minggu ke-6 setelah tanam

Perlakuan IBA (mg/l)	Planlet berakar (%)	Rataan panjang akar (cm)
0	20	2 a
1	100	5.2 b
2	100	5.1 b
3	100	5.2 b

Keterangan: Angka-angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata 5% menurut uji beda nyata jujur (BNJ).

(Supriyati *et al.* 2005).

Bahieldin *et al.* 2000 dan Rashid *et al.* 2002 menyatakan bahwa pembentukan kalus yang dapat diregenerasikan pada tanaman, umumnya tergantung pada genotipe, tipe jaringan, media dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Dalam regenerasi tanaman, baik dari eksplan kalus maupun organ, untuk mendapatkan hasil yang optimum penggunaan media dasar dan zat pengatur tumbuh yang tepat merupakan faktor yang penting (Purnamaningsih dan Lestari

1998). Kombinasi media dasar dan zat pengatur tumbuh yang tepat akan meningkatkan aktivitas pembelahan sel dalam proses morfogenesis dan organogenesis (Lestari 2011).

Kombinasi antara sitokinin dengan auksin yang tepat baik di dalam media maupun di dalam jaringan tanaman dapat memacu morfogenesis dalam pembentukan tunas (Flick *et al.* 1993). Tunas adventif pada tanaman daun dewa diperoleh dari kalus yang diinisiasi menggunakan media MS +2,4-

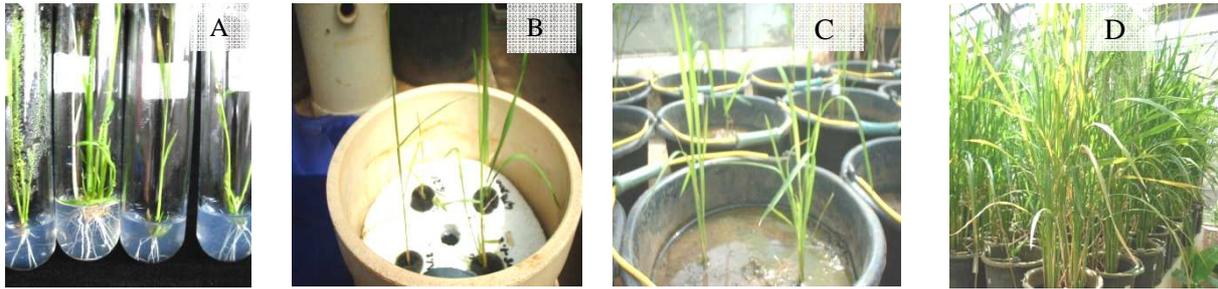


Foto 1. (a) Tunas telah berakar (b) Aklimatisasi menggunakan larutan Yoshida, (c) Bibit hasil aklimatisasi (d) Bibit padi asal radiasi pada kalus.

D 0,1 mg/l + BA 0,1 mg/l + kinetin 2 mg/l kemudian dipindah ke media tanpa zat pengatur tumbuh (Purnamaningsih dan Lestari 1998).

Proliferasi tunas yang optimal pada percobaan ini media diperkaya menggunakan tiga zat pengatur tumbuh BA, zeatin dan IAA. Kombinasi zat pengatur tumbuh BA 3 mg/l + IAA 0,8 mg/l + zeatin 0,1; 0,2 dan 0,3 mg/l, menghasilkan kalus yang memiliki spot hijau hingga 50 dan 30 % (Tabel 4). Sedangkan pada perlakuan sebelumnya tanpa zeatin perlakuan terbaik yang dapat menghasilkan spot hijau adalah pada Ba 2 mg/l + zeatin 0,2 mg/l yaitu sebesar 22,5 %. Namun demikian peningkatan konsentrasi zeatin hingga 0,3 mg/l menyebabkan kemampuan kalus untuk menjadi tunas menurun. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4 bahwa pemberian zeatin 0,1 mg/l pada media MS + BA 3 mg/l + IAA 0,8 mg/l mampu menginduksi terbentuknya tunas hingga 50%. Peningkatan konsentrasi zeatin menjadi 0,2 dan 0,3 mg/l mengakibatkan penurunan kemampuan kalus menjadi tunas menjadi 30% dan 12,5%.

Penggunaan media yang diperkaya dengan sitokinin dan auksin juga telah dilakukan untuk meregenerasikan tunas dari kalus beberapa varietas padi Cisadane, Bengawan Solo, Towuti, Gajahmungkur, dan Jati Luhur (Lestari dan Mariska 2003). Kombinasi sitokinin BA 3 mg/l dan auksin IAA 0,1 mg/l untuk memacu pembentukan tunas dari kalus padi juga dilakukan oleh Edi (2004) pada perlakuan seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap Al dan pH rendah. Kombinasi sitokinin dan auksin ini bukan hanya efektif untuk regenerasi tunas dari

tanaman padi akan tetapi pada tanaman lainnya seperti tanaman *Solanum* (Husni *et al.*, 2004), menggunakan media MS yang diperkaya dengan zeatin 2 mg/l dan IAA 0,1 mg/l.

Pembentukan tunas adventif dari kalus padi *indica* dipengaruhi oleh faktor genetik, sehingga formulasi media untuk masing-masing varietas tidak sama. Alam *et al.* 1998 menggunakan media MS + kinetin 2 mg/l + NAA 0,1 untuk padi *indica* kultivar Vaidehi. Purnamaningsih (2003) menggunakan media MS + BA 5 mg/l + IAA 0,8 mg/l untuk pembentukan tunas dari kalus padi varietas Rojolele (*Javanica*), pada padi varietas Bengawan Solo dan Cisadane.

Kemampuan kalus beregenerasi membentuk tunas selain dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh juga oleh ukuran kalus yang diregenerasikan. Eksplan kalus yang digunakan untuk penelitian adalah yang baru terbentuk dengan ukuran berkisar antara 2-5 mm dengan umur kurang dari 4 minggu, kalus yang ukurannya masih kecil tersebut diduga masih mersitematis dan kandungan zat pengatur tumbuh masih tinggi.

Zat pengatur tumbuh IBA 1-3 mg/l yang diberikan mampu menginduksi pembentukan akar hingga 100% sedangkan tanpa IBA hanya 20% (Tabel 5). Rataan panjang akar pada perlakuan IBA 1 s/d 3 mg/l hampir sama yaitu 5,1-5,2 cm. Dengan demikian konsentrasi 1 mg/l IBA sudah cukup untuk menginduksi pembentukan akar. Tahapan aklimatisasi dapat dilihat pada Foto 1.

Persentase plantlet yang tumbuh saat aklimatisasi di rumah kaca cukup tinggi yaitu 70%, dari

80 tunas yang diaklimatisasi sebanyak 56 tunas yang hidup. Perendaman planlet di dalam larutan Yoshida selama satu minggu sebelum tanaman dipindah ke ember dapat meningkatkan pembentukan akar baru sehingga pertumbuhan tanaman menjadi lebih optimal.

KESIMPULAN

Dosis sinar gamma yang menghasilkan LD₅₀ pada kalus varietas Fatmawati adalah 30 Gy. Formulasi media yang tepat untuk regenerasi kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi sinar gamma adalah MS + BA 3 mg/l + IAA 0,8 mg/l + zeatin 0,1 mg/l. Media terbaik untuk induksi perakaran adalah MS + IBA 1 mg/l.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahieldin A, WE Dyer and R Qu. 2000.** Concentration effect of dicamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breed.* **119**, 437-439.
- Benerji BK and SK Datta. 1992.** Gamma ray induced flower shape mutation in *Chrysanthemum* cv 'java'. *J. Nuclear Agric. Biol.* **21(2)**, 73-79.
- Datta S K. 2001.** Mutation studies on garden *Chrysanthemum*: A review. *Scientific Horticulture* **7**, 159-199.
- Edi S. 2004.** Peningkatan Ketanggungan terhadap Aluminium dan pH Rendah pada Tanaman Padi melalui Keragaman Somaklonal dan Iradiasi Sinar Gamma. *Disertasi*. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Flick CE, DA Evans and WR Sharp. 1993.** Organogenesis. In: DA Evans, WR Sharp, PV Amirato and T Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Tissue Culture*. Collier Macmillan. Publisher London. p. 87-100.
- Gaba VP. 2005.** Plant growth regulator. In: RN Trigiano and DJ. Gray (Eds.) *Plant Tissue Culture and Development*, 87-100. CRC Press. London.
- Herison C, Rustikawati, SH Sutjahjo dan SI Aisyah. 2008.** Induksi mutasi melalui iradiasi sinar gamma terhadap benih untuk meningkatkan keragaman populasi dasar jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Akta Agrosia* **11(1)**, 57-62.
- Husni A, I Mariska dan Hobir. 2004.** Fusi protoplas dan regenerasi hasil fusi antara *Solanum melongena* dan *Solanum torvum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* **9(1)**, 1-7.
- Ismachin M. 1988.** *Pemuliaan Tanaman dengan Mutasi Buatan*. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Atom Nasional. Jakarta.
- Lestari EG dan I Mariska, 2003.** Pengaruh berbagai formulasi media terhadap regenerasi kalus padi indica. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*, 257-263. Bogor, 23-24 September 2003.
- Lestari EG. 2005.** Seleksi *In Vitro* untuk Ketahanan terhadap Kekeringan Tanaman Padi. *Disertasi*. Sekolah Pasca Sarjana, IPB. Bogor.
- Lestari EG. 2008.** *Kultur Jaringan*. Aka Demia.
- Lestari EG dan R Yunita. 2008.** Induksi kalus dan regenerasi tunas padi varietas Fatmawati, *Bul. Agron.* **36(2)**, 106-110
- Lestari EG, R Purnamaningsih, I Mariska dan S. Hutami. 2009.** Induksi keragaman somaklonal dengan iradiasi sinar gamma dan seleksi *in vitro* kalus pisang Raja bulu menggunakan asam fusarat serta regenerasi dan aklimatisasi planlet. *Berita Biologi* **9(4)**, 411-417.
- Lestari EG. 2011.** Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal Agro Biogen* **7(1)**, 63-68.
- Maluszynski M, BS Ahloowalia and B Sigurbjornsson. 1995.** Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* **85**, 303-315.
- Purnamaningsih R dan EG Lestari. 1998.** Multiplikasi tunas temu giring melalui kultur *in vitro*. *Buletin Plasma Nutfah* **1(5)**, 24-27.
- Purnamaningsih R. 2003.** Seleksi *In Vitro* Tanaman Padi untuk Ketahanan terhadap Aluminium. *Thesis S2*. Institut Pertanian Bogor.
- Purnamaningsih R. 2011.** Perakitan varietas baru gandum melalui seleksi *in vitro*. *Warta Litbang Pertanian* **33(4)**, 13-14
- Soeranto H. 2003.** Peran iptek nuklir dalam pemuliaan tanaman untuk mendukung industri pertanian. *Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir P3TM-BATAN*, 308-316. Yogyakarta, 8 Juli 2003.
- Supriati Y, I Mariska dan S Hutami. 2005.** Mikropropagasi sukun (*Artocarpus communis* Forst). Tanaman Sumber Karbohidrat Alternatif. *Berita Biologi* **7(4)**, 207-214.