

Iradiasi Sinar γ pada Biak Tunas Kentang Hitam (*Solanostemon rotundifolius*) Efektif untuk Menghasilkan Mutan

Witjaksono & Aryani Leksonowati

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Science Center,
Jl. Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, Bogor. Telp/Fax : (021) 8765066 / (021) 8765067
Email : tjak_witjaksono@yahoo.com

ABSTRACT

Irradiation of γ -ray at shoot culture of Kentang hitam (*Solanostemon rotundifolius*) is effective for mutant production. Kentang hitam is sterile and vegetatively propagated and therefore its genetic diversity is narrow. Mutation is an alternative way to increase genetic heterogeneity. Irradiation of shoot cultures with different doses followed by culturing of the inoculum (leaf, petiole and internodes) from that irradiated culture on a regeneration medium MS containing 5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA has resulted in curvilinear respon of growth, morphogenesis and plant regeneration. The growth variables increase from 0 to 6 Gy and then decrease to 25 and plateau or increase a little at 35 Gy and growth death was observed at 50 Gy. Leaf and petiole inocula were more responsive than the internode. Respon of growth of shoot regeneration of 50% were obtained at doses of 10-12.5 Gy. However higher level of doses, such as 25 Gy had also been effective for inducing mutant. Morphological and growth different were observed from growth in tissue culture to the field. Mutants were recovered, for example, the one with early flowering.

Keywords : *Solanostemon rotundifolius*, Irradiation, gamma rays, cultur in vitro, mutan

PENDAHULUAN

Kentang hitam (*Solanostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton) merupakan salah satu sumber karbohidrat alternatif yang mempunyai potensi untuk dikembangkan. Umbinya mengandung 20% karbohidrat (terutama pati) dan sekitar 2% protein. Kentang hitam termasuk dalam suku Lamiaceae dan tidak seperti kentang (*Solanum tuberosum*) yang termasuk dalam suku Solanaceae. Tanaman ini berasal dari Afrika Barat, resisten terhadap penyakit yang disebabkan oleh jamur namun

sangat peka terhadap nematoda (Jansen 1996). Kentang hitam, belum populer di masyarakat Indonesia, hanya dikenal oleh penduduk di pulau Jawa, Bali dan Madura (Heyne 1987). Di Indonesia maupun di Afrika, kentang hitam dipakai sebagai pengganti kentang dikonsumsi sebagai sayur, makanan samping dan bahkan sebagai bahan pencampur dalam industri farmasi (Jansen 1996).

Tanaman ini diperbanyak secara vegetatif dengan umbinya maupun stek batang. Tanaman ini biasa berbunga, tetapi tidak menghasilkan biji karena polennya steril (Vimala & Nambisan

Iradiasi Sinar γ pada Biak Tunas Kentang Hitam (*Solanostemon rotundifolius*) Efektif untuk Menghasilkan Mutan

Witjaksono & Aryani Leksonowati

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Science Center,
Jl. Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, Bogor. Telp/Fax : (021) 8765066 / (021) 8765067
Email : tjak_witjaksono@yahoo.com

ABSTRACT

Irradiation of γ ray at shoot culture of Kentang hitam (*Solanostemon rotundifolius*) is effective for mutant production. Kentang hitam is sterile and vegetatively propagated and therefore its genetic diversity is narrow. Mutation is an alternative way to increase genetic heterogeneity. Irradiation of shoot cultures with different doses followed by culturing of the inoculum (leaf, petiole and internodes) from that irradiated culture on a regeneration medium MS containing 5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA has resulted in curvilinear respon of growth, morphogenesis and plant regeneration. The growth variables increase from 0 to 6 Gy and then decrease to 25 and plateau or increase a little at 35 Gy and growth death was observed at 50 Gy. Leaf and petiole inocula were more responsive than the internode. Respon of growth of shoot regeneration of 50% were obtained at doses of 10-12.5 Gy. However higher level of doses, such as 25 Gy had also been effective for inducing mutant. Morphological and growth different were observed from growth in tissue culture to the field. Mutants were recovered, for example, the one with early flowering.

Keywords : *Solanostemon rotundifolius*, Irradiation, gamma rays, cultur in vitro, mutan

PENDAHULUAN

Kentang hitam (*Solanostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton) merupakan salah satu sumber karbohidrat alternatif yang mempunyai potensi untuk dikembangkan. Umbinya mengandung 20% karbohidrat (terutama pati) dan sekitar 2% protein. Kentang hitam termasuk dalam suku Lamiaceae dan tidak seperti kentang (*Solanum tuberosum*) yang termasuk dalam suku Solanaceae. Tanaman ini berasal dari Afrika Barat, resisten terhadap penyakit yang disebabkan oleh jamur namun

sangat peka terhadap nematoda (Jansen 1996). Kentang hitam, belum populer di masyarakat Indonesia, hanya dikenal oleh penduduk di pulau Jawa, Bali dan Madura (Heyne 1987). Di Indonesia maupun di Afrika, kentang hitam dipakai sebagai pengganti kentang dikonsumsi sebagai sayur, makanan samping dan bahkan sebagai bahan pencampur dalam industri farmasi (Jansen 1996).

Tanaman ini diperbanyak secara vegetatif dengan umbinya maupun stek batang. Tanaman ini biasa berbunga, tetapi tidak menghasilkan biji karena polennya steril (Vimala & Nambisan

2005). Sterilitas polen tersebut disebabkan karena ketidaknormalan sitogenetik yang meliputi disinapsis (Vasudevan *et al* 1967 dalam Vimala & Nambisan 2005), meiosis tidak teratur (Ramachandran 1967 dalam Vimala & Nambisan 2005), sehingga dapat diperkirakan keragaman genetik kentang hitam sempit. Peningkatan keragaman genetik tanaman yang secara alamiah sempit dapat dilakukan dengan manipulasi sel somatik seperti misalnya induksi variasi somaklonal, mutasi, hibridisasi somatik dan transformasi genetik.

Pemuliaan mutasi telah banyak menghasilkan varietas baru (Anonymous 1970). Keragaman genetik yang terinduksi karena mutasi selanjutnya dapat dilestarikan dalam bentuk varietas melalui perbanyakan vegetatif. Generasi ke-2 ginseng Jawa hasil mutasi mempunyai biomasa akar delapan kali biomasa tanaman kontrol (Poerba 2004). Induksi mutasi pada mawar menghasilkan mutan mawar dengan warna putih dan merah di pinggirnya (Soedjono 2003). Sedangkan iradiasi sinar gamma pada *Curcuma alismatifolia* menimbulkan keragaman waktu munculnya tunas yang menjadi lebih lama, perubahan klorofil daun dan morfologi bunga (Abdullah *et al.* 2009). Iradiasi ruas batang dengan satu buku dilaporkan menghasilkan keragaman produksi umbi kentang hitam (Abraham & Radakhrisan 2009).

Induksi mutasi melalui kultur jaringan dapat diarahkan untuk mendapatkan genotipe yang lebih baik dari induknya seperti ukuran umbi lebih besar, kualitas umbi/tepung yang lebih baik, kandungan bahan aktif yang lebih

tinggi, tahan hama/penyakit atau karakter tanaman. Induksi mutasi *in vitro* pada sel-sel yang mampu beregenerasi akan menghasilkan mutan utuh dan tidak memerlukan pemisahan khimera. Karena jumlah sel yang menyusun suatu organ daun banyak, maka mutasi pada daun juga akan menimbulkan banyak sel mutan yang selanjutnya beregenerasi menjadi tanaman mutan dalam jumlah banyak. Regenerasi kentang hitam secara kultur jaringan telah berhasil dilakukan baik melalui perbanyakan tunas samping maupun regenerasi melalui tunas adventif baik langsung (Leksonowati & Witjaksono 2012) maupun tidak langsung yaitu melalui kalus (Hoesen 1991; Prematilake 2005). Tanaman kentang hitam sangat responsif terhadap manipulasi *in vitro*; tanaman yang diregenerasi dari kalus menunjukkan variasi somaklonal (Prematilake 2005). Oleh karena itu protokol induksi mutasi dan regenerasi tanaman kentang hitam *in vitro* diperlukan karena diperkirakan dapat dipakai untuk meningkatkan keragaman genetik kentang hitam.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan tanaman yang digunakan dalam percobaan iradiasi ini berupa biak kentang hitam aksesori Nganjuk 1 umur 6-7 minggu yang ditumbuhkan pada botol biak berukuran 100 ml dan diisi 25 ml medium tumbuh formulasi MS (Murashige & Skoog 1962) yang dimodifikasi dan terdiri dari (mg/l): NH_4NO_3 1650, KNO_3 1900, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370, KH_2PO_4 170, hara mikro, vitamin

(Glycine 4, Pyrodixine 1, Thiamin 0.2, Nicotinic acid 0.5), sukrosa 30.000 dan zat pengatur tumbuh BA 0,5 dan NAA 0,1 (Leksonowati & Witjaksono 2012). Medium dipadatkan dengan 3 g/l Gelrite. Medium tumbuh diatur dengan 0,1 NHCl atau KOH sehingga pH menjadi 5.7-5.8 sebelum ditambah Gelrite. Medium kemudian diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi selama 20 menit. Biak dipelihara di dalam ruang pemeliharaan biak dengan suhu 25°C pada rak kultur dengan intensitas cahaya sekitar 261-352 lux selama 16 jam per hari.

Percobaan iradiasi dengan sinar gamma dengan dosis 0, 6, 12.5, 25, 35 dan 50 Gray dilakukan di Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jl. Lebak bulus, Jakarta. Iradiasi dipaparkan pada biak tunas dalam botol aksesori Nganjuk 1. Paling lama sehari kemudian biak yang telah diiradiasi dipakai sebagai sumber bahan tanaman (inokulum). Inokulum berupa potongan daun, tangkai daun dan ruas batang diambil dari biak yang telah diradiasi disubkultur di medium regenerasi yang mempunyai formulasi MS seperti pada medium biak tunas tetapi dengan zat pengatur tumbuh 5 mg/l BA dan 0.1 mg/l NAA yang diwadahi dalam petridish 100 x 20 mm.

Inokulum daun yang dipakai berukuran sekitar 0,5 cm², dan diambil dari posisi kedua sampai dengan empat dari pucuk pada batang (Suherlina *et al.* 2012). Daun dipotong pada keempat sisinya. Jika berukuran besar, daun dibagi menjadi 2-6 potongan. Potongan daun ditanam dengan posisi tengkurap (adaksial kontak medium). Sedangkan inokulum tangkai dan ruas batang

berukuran panjang 0.5-1 cm. Tiap perlakuan iradiasi terdiri dari 5 ulangan, dan masing-masing ulangan diisi 10-14 inokulum. Biak disimpan dalam ruang pemeliharaan biak seperti pada biak tunas tersebut di atas.

Pengamatan pertumbuhan biak yang meliputi persentase inokulum hidup, membentuk kalus, tunas, dan jumlah tunas dilakukan pada minggu ketiga sejak inokulum ditanam pada medium regenerasi. Tahapan ini inokulum belum mengalami subkultur dan karena itu dinamai subkultur ke-0 (S_0). Nilai LD_{50} (lethal dose 50%) ditentukan dari persentase inokulum yang hidup sebanyak 50% dari kontrol tanpa iradiasi. Tunas yang tumbuh pada inokulum yang diuji, diamati pertumbuhannya (kalus atau tunas) pada umur 6 minggu. Pembentukan kalus merupakan respon pertumbuhan karena itu dalam hubungannya dengan dosis iradiasi, ukuran dari pertumbuhan yang mencapai 50% dari kontrol dinamai dosis respon 50% atau disingkat RD_{50} (Response dose 50%). Penamaan ini mengikuti dosis proliferasi kalus yang menunjukkan pertumbuhan kalus dibandingkan kontrol tanpa radiasi (Witjaksono & Litz 2004). Data disajikan dalam grafik regresi yang dibuat dengan program Sigma Plot ataupun histogram dengan error bar yang dibuat dengan program Excel.

Tunas-tunas yang tumbuh dari inokulum awal (daun, potongan) dipisahkan menjadi beberapa tunas/clump kemudian disubkultur ke medium pembesaran dengan formulasi yang sama dengan medium regenerasi tetapi tanpa zat pengatur tumbuh. Pada

subkultur yang pertama ini (S1), pengamatan pertumbuhan biak dilakukan setelah berumur 2 bulan terhadap jumlah dan tinggi tunas. Selain itu dilakukan juga pengamatan terhadap perubahan morfologi biak setelah iradiasi.

Biak tunas pada medium tanpa zat pengatur tumbuh yang telah berumur 6 minggu dibersihkan dari agar medium dengan menambahkan air ke dalam botol kultur dan dengan hati-hati mengeluarkan tunas sehingga tidak banyak akar yang rusak. Selanjutnya akar planlet tersebut dicuci dengan air mengalir kemudian direndam larutan fungisida Benstar (bahan aktif benlate) dan bakterisida Agrept (bahan aktif agrimicin) sesuai dosis rekomendasi. Planlet ditanam dalam bak plastik berukuran 45 x 35 x 15 cm yang telah diisi dengan medium campuran sekam: tanah: pasir: cocopeat (2:1:5:9). Medium ditanak 6 jam untuk pasteurisasi sebelum dipakai. Bak plastik dengan planlet di dalamnya di tutup plastik bening dan diikat dengan tali karet untuk mempertahankan kelembaban. Planlet disiram 2 g/l larutan pupuk Growmore (15N-15P-15K) seminggu sekali. Sesekali tutup plastik dibuka untuk memeriksa kelembaban medium dan disiram air bila perlu. Bak aklimatisasi di letakkan di greenhouse yang pada atapnya ditutup paranet 65%. Setelah 4-6 minggu daun baru tumbuh pada plantlet dan plastik dibuka dan biak dibiarkan selama 2 minggu untuk beradaptasi dengan kelembaban udara ambient sebelum ditranplant di polibag.

Planlet yang telah berakar dari bak aklimatisasi di tanam pada medium transplanting dalam polibag yang terdiri

dari tanah : kompos : arang sekam (4:5:1). Bibit transplant dipelihara di dalam greenhouse dengan naungan 65% selama 4-6 minggu.

Pengamatan terhadap aklimatisasi dan transplanting yang dilakukan pada percobaan ini dilakukan pada saat yang sama, bukan dari percobaan yang berurutan. Karena itu data dari jumlah tanaman di polibag tidak berasal dari jumlah planlet dari pengamatan aklimatisasi. Jumlah total bibit dari bak aklimatisasi dan polibag menunjukkan jumlah keseluruhan bibit/tanaman dari percobaan iradiasi yang dilakukan.

Bibit tranplant setelah berumur 4-6 minggu di tanam di lapang dengan jarak tanam 50 cm. Tanah diolah, digemburkan dan dibentuk guludan dan diberi pupuk kandang sebanyak 25 kg/meter². Tanaman disemprot dengan Decis secara rutin untuk melindungi dari hama ulat dan serangga. Pada musim kemarau, tanaman disiram secara berkala untuk menghindari kekeringan.

HASIL

Pengaruh dosis iradiasi sinar γ terhadap daya hidup berbagai inokulum kentang hitam *in vitro*.

Induksi mutasi menggunakan sinar γ berbagai dosis terlihat sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan daya hidup inokulum. Pertumbuhan inokulum dapat dikelompokkan pada beberapa kategori: sebagian besar berubah menjadi coklat dan mati pada hari pertama pada perlakuan 35 dan 50 Gy, sebagian besar bertahan tetap hijau sampai minggu pertama kemudian

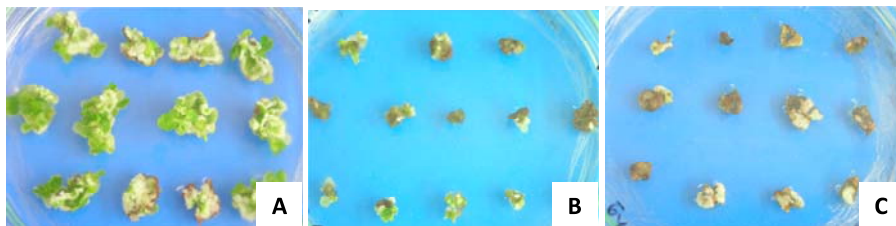
menguning atau mencoklat dan mati pada perlakuan 12,5 dan 25Gy, dan sebagian besar bertahan hijau sampai seminggu lalu tumbuh membesar dan membentuk kalus atau tunas pada perlakuan 0 dan 6 Gy. Pada inokulum daun perubahan daya hidup teramati secara nyata (Gambar 1A-C). Sejumlah kecil inokulum pada dosis iradiasi tinggi tetap tumbuh membentuk kalus atau tunas.

Analisis regresi dari daya hidup inokulum daun terhadap dosis iradiasi menunjukkan respon curvilinear dengan persamaan $Y = 89.9 - 1.8X - 0.1X^2$ dan koefisien korelasi $R^2 = 0.95$. Secara visual, daya hidup inokulum daun meningkat dari dosis 0 ke dosis 6, lalu menurun secara linear mencapai nilai nol ke dosis 25 Gy (Gambar 2 A). Dosis penyebab respon daya hidup sebanyak 50% dari kontrol tanpa iradiasi (LD_{50}) dapat dihitung dicapai pada dosis 14.1 Gy. Respon yang serupa juga diperoleh pada inokulum tangkai daun ($Y = 77.1 - 1.2X - 0.04X^2$, $R^2 = 0.87$) (Gambar 2 B), dengan perbedaan bahwa LD_{50} dicapai pada dosis 19,5 Gy. Pada inokulum ruas batang, respon daya hidup terhadap dosis iradiasi terlihat berbeda tetapi sesuai dengan curvilinear model ($Y = 51.9 - 4.2X + 0.1X^2$, $R^2 = 0.98$). Secara visual, pada inokulum ruas batang, respon daya

hidup menurun secara linear dari kontrol sampai dosis 12,5 Gy dan melandai pada dosis 25 Gy dan seterusnya (Gambar 2 C). Dengan respon seperti ini LD_{50} diperkirakan dicapai pada dosis 5,5 Gy. Perbedaan LD_{50} antara inokulum yang berbeda menunjukkan perbedaan kepekaan jaringan untuk tumbuh setelah dipapar sinar gamma.

Pengaruh dosis iradiasi sinar gamma terhadap morfogenesis berbagai inokulum kentang hitam *in vitro*.

Iradiasi berpengaruh secara nyata terhadap morfogenesis dari ketiga inokulum yang diuji. Pada inokulum daun, kalus hanya terbentuk pada dosis iradiasi dari 0-12,5 Gy dengan kecenderungan respon curvilinear yang mencapai maksimum pada dosis 6 Gy (39%) dan menurun pada sampai 12.5 Gy, dan RD_{50} diperkirakan 22 Gy. Pada inokulum tangkai daun, respon pembentukan kalus menunjukkan kecenderungan curvilinear, yang dicirikan oleh peningkatan respon dari dosis 0 sampai dosis 6 Gy dan mencapai maksimum (39%) selanjutnya menurun pada dosis 12,5 Gy dan menurun dengan kemiringan yang lebih tajam pada dosis 25 Gy dan selanjutnya menurun lagi dengan kemiringan yang lebih landai pada dosis 35 Gy dan tanpa pembentukan kalus



Gambar 1. Inokulum kentang hitam yang berumur 3 minggu setelah disubkultur pada dosis iradiasi 0-6Gy (A), 12,5-25 Gy (B), 35-50 Gy (C)

pada 50 Gy. RD_{50} pembentukan kalus inoculum tangkai daun diperkirakan 24 Gy. Sedangkan pada inoculum ruas batang, respon pembentukan kalus sangat rendah dengan nilai maksimum sekitar 5% sehingga sukar dilihat kecenderungannya (Gambar 3 A).

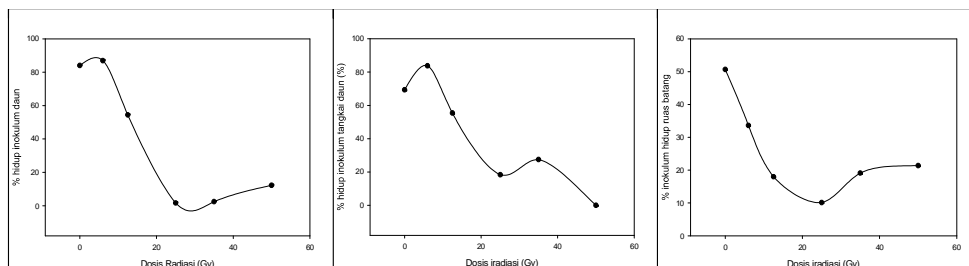
Respon persen pembentukan tunas dari inoculum daun dan tangkai daun menunjukkan respon curvilinear, dengan nilai maksimum respon yang lebih tinggi pada inoculum daun (Gambar 3 B). Nilai RD_{50} diperkirakan 12,5 Gy. Namun seperti halnya respon pembentukan kalus, respon pembentukan tunas dari inoculum ruas batang sangat rendah sehingga kecenderungan responnya sukar dipelajari (Gambar 3 B). Pada dosis 50

Gy, tunas sama sekali tidak terbentuk pada ketiga inoculum.

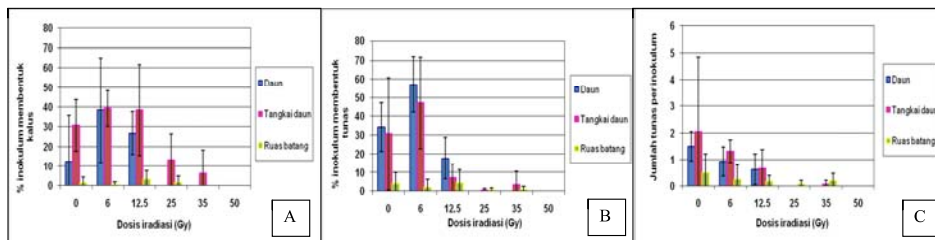
Respon jumlah tunas per inoculum cenderung menurun linear dari dosis rendah ke dosis yang lebih tinggi untuk ketiga inoculum (Gambar 3 C). RD_{50} untuk respon ini diperkirakan tercapai pada dosis 8 Gy untuk inoculum daun dan 10 Gy untuk inoculum tangkai daun.

Pertumbuhan tunas hasil regenerasi dari inoculum daun, tangkai daun dan ruas batang yang telah diiradiasi pada subkultur pertama (S1)

Tinggi tunas pada medium pembesaran tunas dari tunas yang berasal dari inoculum daun masih terpengaruh oleh dosis iradiasi dan



Gambar 2. Respon curvilinear dari respon daya hidup terhadap dosis iradiasi dari inoculum daun ($Y = 89.9 - 1.8x - 0.1x^2$, $R^2 = 0.95$), tangkai daun ($Y = 77.1 - 1.2X - 0.04X^2$, $R^2 = 0.87$), dan ruas batang ($Y = 51.9 - 4.2X + 0.1X^2$, $R^2 = 0.98$) umur 3 minggu.



Gambar 3. Pengaruh dosis iradiasi inoculum daun, tangkai daun dan ruas batang terhadap respon pembentukan kalus, pembentukan tunas dan jumlah tunas per inoculum yang terbentuk pada umur enam minggu setelah iradiasi.

menunjukkan respon curvilinear seperti pada respon regenerasi (Gambar 4 A). Respon tinggi tunas dari tunas yang berasal dari inokulum tangkai daun menunjukkan kemiripan dengan respon tinggi tunas dari inokulum daun dengan perbedaan nilai antar dosis yang tidak nyata. Tinggi tunas dari inokulum ruas batang juga tidak menunjukkan respon nyata terhadap dosis iradiasi walaupun ada kecenderungan menurun (Gambar 4A). Perbedaan tinggi tanaman dari inokulum yang berbeda cenderung tidak nyata dan tidak menunjukkan pola yang jelas, walaupun pada beberapa dosis terjadi perbedaan yang nyata.

Jumlah tunas yang terbentuk per inokulum tidak berbeda nyata dengan pertambahan dosis iradiasi. Perbedaan jumlah tunas yang terbentuk per inokulum juga tidak berbeda antar asal inokulum (Gambar 4B). Jumlah tunas per inokulum mencapai rata-rata 6 tunas.

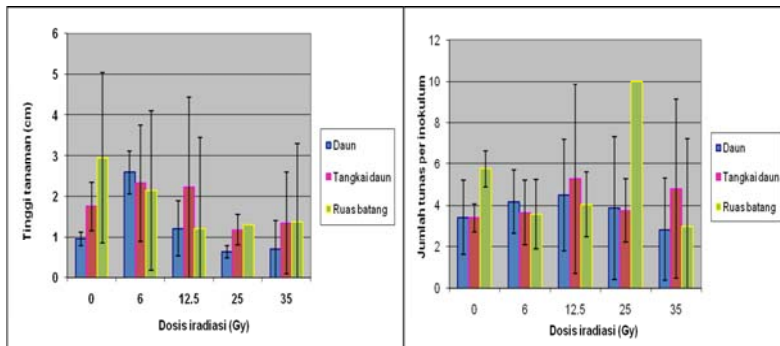
Pengaruh dosis iradiasi terhadap morfologi kentang hitam hasil iradiasi

Dosis iradiasi tidak hanya berpengaruh terhadap respon

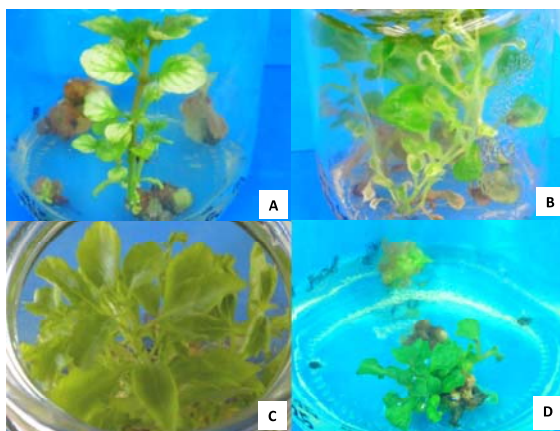
morfogenesis dari inokulum daun, tangkai daun dan ruas batang, tetapi juga berpengaruh pada morfologi dari biak yang dihasilkannya. Perubahan yang teridentifikasi antara lain morfologi daun yang menjadi tidak normal. Selain itu, daun albino pada helaiannya (Gambar 5 A), maupun pada tepiannya sehingga menyerupai variegata (Gambar 5 B) juga teramati. Perbedaan bentuk daun yang teramati anatara lain ujung meruncing (Gambar 5 C). Pada dosis 12.5 dan 25 Gy banyak biak yang diperoleh berbentuk roset, dengan buku sangat rapat dengan jumlah tunas yang banyak pada satu inokulum (Gambar 5 D). Biak yang tumbuh dari hasil iradiasi ini juga banyak yang mengalami gejala *hiperhydricity* atau menggelas.

Aklimatisasi, trasplanting dan morfologi mutan di lapang.

Banyaknya tanaman yang diaklimatisasi di greenhouse cenderung meningkat dari kontrol tanpa iradiasi ke dosis iradiasi 6 Gy lalu menurun lagi sampai dosis iradiasi 35 Gy (Tabel 1). Kecenderungan ini teramati pada semua inokulum yang diamati, walaupun pada



Gambar 4. Pertumbuhan tunas setelah disubkultur sekali (S1) yang berasal dari inokulum kentang hitam yang diiradiasi. A) tinggi tanaman (cm) dan B) jumlah tunas.



Gambar 5. Pengaruh dosis iradiasi terhadap morfologi biak tunas hasil regenerasi. A) albino (12.5 Gy), B) variegata (25 Gy), C) bentuk daun meruncing (25 Gy), D) kerdil (25 dan 35 Gy).

inokulum yang berbeda jumlah tunas yang diaklimatisasi berbeda dan tangkai daun menunjukkan jumlah yang tertinggi (Tabel 1). Pada saat diaklimatisasi, morfologi daun dari tanaman yang berasal dari perlakuan iradiasi yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan, kecuali pertumbuhan. Pertumbuhan yang paling bagus terdapat pada dosis 6 Gy dan menurun pada dosis 12.5 Gy dan 25 Gy (kerdil). Jumlah tanaman yang bertahan tumbuh di polibag juga mempunyai pola yang sama dengan pertumbuhan bibit diaklimatisasi. (Tabel 1).

Sejumlah tanaman hasil iradiasi dan tanpa iradiasi telah ditanam di lahan (Tabel 2). Variasi morfologi ukuran daun maupun pertumbuhan terlihat diantara aksesori dan karena itu aksesori tanaman yang menunjukkan morfologi yang berbeda disimpulkan sebagai mutan. Tanaman yang diperoleh dari perlakuan iradiasi 6 Gy tidak menunjukkan perbedaan morfologi yang nyata dibanding kontrol, bahkan cenderung

tumbuh lebih subur. Namun tanaman yang diperoleh dari perlakuan iradiasi yang lebih tinggi menunjukkan variasi pigmentasi daun, menjadi lebih pendek, daun lebih meruncing, daun bertumpuk. Selain itu juga diperoleh mutan yang menunjukkan pembungaan yang lebih awal (Gambar 6 B) dari kontrol tanpa perlakuan iradiasi (Gambar 6 A)

PEMBAHASAN

Kentang hitam adalah tanaman yang membiak secara vegetatif dan secara alamiah steril dan karena itu keragaman genetiknya diperkirakan sempit. Perbaikan tanaman ini, karena itu, memerlukan induksi keragaman genetik secara buatan seperti induksi mutasi. Protokol induksi mutasi pada kentang hitam telah berhasil kami kembangkan dan laporkan pada makalah ini dengan mengambil manfaat kemampuan kentang hitam diregenerasi secara

Tabel 1. Jumlah bibit kentang hitam klon Nganjuk 1 dari perlakuan iradiasi yang hidup pada tahap aklimatisasi dan transplanting

Inokulum asal	Irradiasi (Gy)	Jumlah bibit aklimatisasi	Jumlah bibit transplant (polibag)	Jumlah bibit total
Daun	0	15	9	26
	6	24	64	88
	12.5	14	9	23
	25	0	1	3
	35	34	22	56
Tangkai Daun	0	27	8	35
	6	96	21	117
	12.5	58	21	79
	25	10	1	11
	35	0	0	0
Ruas	0	34	24	58
Batang	6	62	19	81
	12.5	5	2	7
	25	0	2	2
	35	28	6	34

Keterangan: data tanaman yang diaklimatisasi dan ditransplanting mencakup keseluruhan tanaman

Tabel 2. Kentang hitam klon Nganjuk 1 hasil induksi mutasi yang ditanam di lapangan.

Inokulum	Perlakuan	Jumlah tanaman di lapang
	Dosis iradiasi	
Daun	6 Gy	22
Daun	12.5 Gy	6
Batang	0 Gy	8
Batang	12.5 Gy	2
Tangkai daun	0 Gy	2
Tangkai daun	6 Gy	6
Tangkai daun	25 Gy	3

langsung dari inokulum daun, tangkai daun ruas batang dari biak tunas in vitro (Leksonowati & Witjaksono 2012). Induksi mutasi secara in vitro menghemat tempat dan waktu karena dalam kultur in vitro, pertumbuhan cepat dan ukuran kecil. Abraham & Rajakhrisnan (2009) melaporkan keragaman ukuran dan

produksi umbi dari mutan yang diperoleh dari iradiasi ruas batang dengan satu buku. Teknik yang dipakai seharusnya mensyaratkan beberapa kali penyetekan untuk menghilangkan kimera yang mungkin terjadi, tetapi hal ini tidak dijelaskan dalam makalah tersebut.



Gambar 6. Pertumbuhan dan morfologi tanaman kentang hitam di lapang hasil regenerasi perlakuan iradiasi sinar γ dari inokulum tangkai daun. A) kontrol, 0 Gy, B) tanaman berbunga lebih awal, 25 Gy.

Respon pertumbuhan (persen daya tumbuh, pembentukan kalus maupun pembentukan tunas) terhadap dosis iradiasi pada kentang hitam cenderung bersifat curvilinear yaitu meningkat pada dosis rendah dan kemudian menurun pada dosis tinggi dan dengan koefisien korelasi yang lebih tinggi (87-98%). Pola respon terhadap dosis iradiasi yang curvilinear juga dilaporkan pada apokat (Fuentes *et al.* 2009), dan talas (*Colocasia esculenta*) (Seetohul *et al.* 2009). Iradiasi pada dosis tinggi menyebabkan kematian pada sel atau jaringan sedangkan iradiasi pada dosis rendah justru memicu pertumbuhan sel. Iradiasi pengion dosis tinggi dapat mengakibatkan kerusakan sel karena adanya gangguan pada molekul air, DNA, enzim dan zat pengatur tumbuh dalam sel (Handro 1981).

Perbedaan respon antara inokulum dan bahwa daun dan tangkai daun menunjukkan respon regenerasi yang lebih baik dari ruas batang sesuai dengan kapasitas regenerasi dari inokulum tersebut menurut penelitian sebelumnya tentang organogenesis kentang hitam (Leksonowati & Witjaksono 2012) dan dengan demikian irradiasi tidak merubah

kapasitas regenerasi dari suatu jaringan. Iradiasi telah ditunjukkan dapat meningkatkan kemampuan regenerasi. Pada kultur kalus *Anthurium andreanum*, pemberian dosis iradiasi sebesar 100 RAD dapat merangsang pembentukan tunas (Pierik 1987). Sedangkan pemberian dosis iradiasi sebesar 500 RAD secara nyata merangsang pembentukan tunas dari eksplan tanaman gerbera (Prasetyorini 1991).

Pada dosis iradiasi yang diuji, respon pertumbuhan 50% dicapai pada dosis yang berbeda-beda, antara 5.5 sampai 19,5 Gy untuk daya hidup, 22-24 Gy untuk pembentukan kalus dan antara 6-12,5 Gy untuk pembentukan tunas. Karena regenerasi tunas mutan yang menjadi tujuan, maka pemilihan dosis radiasi selayaknya menggunakan peubah regenerasi tunas. Karena antara dosis iradiasi 6 Gy sampai 35 Gy dihasilkan tunas, walaupun dosis respon pembentukan tunas sebanyak 50% jatuh pada dosis sekitar 12,5 Gy, maka percobaan iradiasi seharusnya tidak hanya mengikuti dosis RD_{50} . Dosis yang lebih rendah atau lebih tinggi dari RD_{50} perlu dimanfaatkan. Penanaman di

lapang terhadap tanaman hasil iradiasi dibandingkan kontrol menunjukkan perbedaan morfologi pada tanaman dari perlakuan iradiasi dosis 12,5-25 Gy. Karena itu dosis 12,5-25 Gy dapat direkomendasikan sebagai dosis perlakuan iradiasi pada kentang hitam.

Iradiasi sinar γ dapat menyebabkan terhambatnya pembentukan klorofil sehingga daun menjadi albino atau variegata. Hal ini juga dijumpai pada kentang hitam. Adanya variasi klorofil tersebut kemungkinan karena adanya mutasi yang mengakibatkan gangguan fisiologi dalam sintesis klorofil sehingga terjadi defisiensi klorofil pada daun. Adanya variasi klorofil tersebut kemungkinan karena adanya mutasi yang mengakibatkan gangguan fisiologi dalam sintesis klorofil sehingga terjadi defisiensi klorofil pada daun (Grosch & Hopwood 1979). Banerji *et al.* (1987) melaporkan bahwa persentase tertinggi dari tanaman yang berdaun variegata diperoleh pada perlakuan 7.5 Gy dimana variasi penyebaran klorofil terlihat di bagian tertentu pada daun atau keseluruhan daun. Sedangkan persentase daun abnormal tertinggi diperoleh pada perlakuan 10 Gy. Tanaman yang diiradiasi juga umumnya menghasilkan penyimpangan pada daun termasuk kekerdilan, penebalan, perubahan bentuk dan tekstur, kerutan, lekukan yang abnormal, keriting pada pinggir daun, perubahan bentuk tulang daun, fusi dan perubahan warna daun.

Protokol yang dikembangkan sangat sederhana dan meliputi penumbuhan biak *in vitro* pada medium MS dengan konsentrasi BA dan NAA rendah. Biak tunas pada pertumbuhan maksimum

yang telah berumur 5-6 minggu dan masih dalam botol mediumnya diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 12,5-35 Gy. Paling lambat sehari kemudian, dari biak yang diiradiasi diambil daun dan tangkai daun dan ditumbuhkan pada medium regenerasi yang berisi medium MS ditambah 5 mg/l BA dan 0,1 mg/l NAA selama 6 minggu. Tunas yang tumbuh kemudian disubkultur pada medium MS tanpa zat pengatur tumbuh untuk pembesaran tunas. Tunas kemudian diaklimatisasi dan dibesarkan pada medium tanah dalam polibag. Tanaman putative mutan telah ditanam di lahan dan menunjukkan keragaman genetik seperti pembungaan lebih awal.

KESIMPULAN

Iradiasi pada dosis 6-35 Gy pada biak tunas diikuti regenerasi dari inokulum daun, tangkai daun dan ruas batang efektif dalam menghasilkan mutant misalnya dengan karakter pembungaan lebih awal serta morfologi daun yang berbeda. Teknik iradiasi dan regenerasi yang dikembangkan terbukti efektif dalam menginduksi keragaman genetik pada kentang hitam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari DIPA 2008-2010 Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Katarina Utami Nugraheni, S.P., Yudhisa, Nenah, Enjut, Omi, Biah dan almarhumah Nur atas bantuan teknis selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, TL., J. Endan, BM. Nazir. 2009. Changes in Flower Development, Chlorophyll Mutation and Alteration in Plant Morphology of *Curcuma alismatifolia* by gamma irradiation. *Amer.J.Appl. Sci.* 6(7): 1436-1439.
- Abraham M & VV Radhakrishna. 2009. Induced Mutations in Coleus (*Solenostemon rotundifolius*) (Poir. J.K. Mortan) – An Under-Utilized Medicinal Tuber. In: Q.Y. Shu (ed.), *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p 283-285
- Anonymous. 1970. Manual on Mutation Breeding. *Technical Reports Series* No. 119. International Atomic Energy Agency, IAEA, Vienna.
- Banerji, BK., P. Nath & SK. Datta. 1987. Mutation breeding in double bracted Bougainvillea cv. 'Roseville's Delight'. *J. Nuclear Agric. Biol.* 16:45-47.
- Fuentes, JL., L. Santiago, NN. Rodríguez, OC. Arbelo, A. Alvarez, Y. Valdés, M. Vernhe, M. Guerra, S. Altanez, EF. Prieto, B. Velázquez, JA. Rodríguez, DG. Sourd, VR. Fuentes & MR. Leal. 2009. Combining zygotic embryo culture and mutation induction to improve salinity tolerance in avocado (*Persea americana* Mill). Induced Mutation in Tropical Fruit Tree. IAEA Tecdoc 1615. International Atomic Energy Agency, May 2009. Pp.71-82. (<http://mvgs.iaea.org/pdf/TECDOC1615.pdf>)
- Grosch, DS. & LE. Hopwood. 1979. *Biological Effect of Radiation*. Second edition. London: Academic Press.
- Heyne, H. 1987. *Tumbuhan berguna Indonesia. Balitbang Kehutanan*. Departemen Kehutanan RI. Jakarta
- Handro, W. 1981. Mutagenesis and *in vitro* Selection. In: Thorpe TA (ed). *Plant Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture*. New York: Academic Press.
- Hoesen, DSH. 1991. Biak jaringan kentang hitam (*Coleus tuberosus* Benth.) Dalam: Witjaksono, Marwoto RM & Supardiyono EK (eds.) Prosiding Seminar hasil Penelitian dan pengembangan Sumberdaya hayati 1990/1991. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI. Bogor, 99-104.
- Jansen, PCM. 1996. *Plectranthus rotundifolius* (Poirot) Sprengel. In: Flach, M. & F. Rumawas (eds.). *Plant yielding non-seed Carbohydrates*. PROSEA, Bogor, 141-143.
- Leksonowati, A. & Witjaksono. 2012. Morfogenesis pada daun, tangkai daun, dan ruas batang kentang hitam (*Solenostemon rotundifolius* (poir) JK Morton) secara *in vitro*. *Berkala Penelitian Hayati* (in press).
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

- culture. *Physiol Plants*. 15: 473-497.
- Pierik, RLM. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Neterland: Martinus Nijhoff Publishers
- Prasetyorini. 1991. Pengaruh radiasi sinar gamma dan jenis eksplan terhadap keragaman somaklonal pada tanaman gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Fakultas Pascasarjana.
- Prematilake, DP. 2005. Inducing genetic variation of innala (*Solanostemon rotundifolius*) via *in vitro* callus culture. *J. Natn. Sci. Found. Sri Lanka* 33: 23-131.
- Poerba, YS. 2004. Penampilan genotipe som jawa [*Talinum paniculatum* Jacq. (Gaertn.)] pada generasi M2. *Berita Biologi* 7(3). 127-135.
- Seetohul S., V. Maunkee & M. Gungadurdoss. 2009. Improvement of Taro (*Colocasia esculenta var esculenta*) through In Vitro Mutagenesis. *In*: QY. Shu (ed.), *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p 296-299
- Soedjono, S. 2003. Aplikasi mutasi induksi dari variasi somaklonal dalam pemuliaan tanaman. *J. Litbang Pertanian*. 22(2): 70-78.
- Suherlina, T., A. Leksonowati & Witjaksono 2012. Pengaruh umur biak dan posisi daun kentang hitam (*Solenostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton) in vitro. *Berkala Penelitian Hayati* (Submitted)
- Vimala, B. & B. Nabisan. 2005. Tropical Minor Tuber Crops. Central Tuber Crops Research Institute Sreekarayam, Thiruvananthapuram 695 017, Kerala, India. 24p.
- Witjaksono & RE. Litz. 2004. Effect of gamma irradiation of avocado embryogenic cultures and somatic embryo recovery. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77:139-147

Memasukkan: Agustus 2011

Diterima: Januari 2012