

**Induksi Mutasi Kalus Embriogenik Gandum (*Triticum aestivum* L.)
melalui Iradiasi Sinar Gamma untuk Toleransi Suhu Tinggi**

***Mutation Induction on Embryogenic Callus of Wheat (*Triticum aestivum* L.)
through Gamma Ray Irradiation for High Temperature Tolerance***

Ryan Budi Setiawan¹, Nurul Khumaida^{2*}, dan Diny Dinarti²

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
(Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 14 Juni 2014/Disetujui 29 Oktober 2014

ABSTRACT

Mutation techniques through gamma ray irradiation is useful to support breeding programs for genetic improvement of wheat. Genetic improvement on tolerance to high temperatures is necessary for development of wheat in Indonesia. The purpose of this study was to determine the level of radiosensitivity to be used as the basis for the induction of mutations by gamma ray irradiation on embryogenic callus to obtain putative mutants with high temperature tolerance. Explants used were embryogenic callus cultured on MS medium containing 30 g L⁻¹ sukrosa, 2 g L⁻¹ gelrite, 2 mg L⁻¹ 2.4D and 1 mg L⁻¹ picloram. Culture incubated for 6 weeks with temperature 20±4 °C in the room culture. Five irradiation doses (10, 20, 30, 40 and 50 Gy) were used in radiosensitivity testing. A factorial, completely randomized design was applied to the experiment. The first factor was selection temperature with three levels (25, 30 and 35 °C), and the second factor was doses of gamma ray irradiation with three levels (10, 20, and 30 Gy). The result showed that radiosensitivity levels varied among varieties, LD₂₀: 7.79 to 18.96 Gy and LD₅₀: 24.29-33.63 Gy. Selayar variety which has highest sensitivity value compared with Dewata and Nias. Increasing doses of irradiation and temperature decrease survival of embryogenic callus, number of embryos, and percentage of germinated plantlets. Based on in vitro selection using high temperature (25, 30, and 35 °C), the obtained 19 putative mutants were derived from embryos that appear on the surface of embryogenic callus survival after irradiation and high temperature selection.

Keywords: in vitro selection, putative mutant, radiosensitivity, somatic embryo

ABSTRAK

Teknik mutasi melalui iradiasi sinar gamma dapat digunakan untuk menunjang program pemuliaan tanaman dalam rangka perbaikan genetik tanaman gandum. Perbaikan genetik seperti toleransi terhadap suhu tinggi perlu dilakukan untuk pengembangan gandum di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah menentukan nilai radiosensitivitas yang akan digunakan sebagai dasar induksi mutasi melalui iradiasi sinar gamma pada kalus embriogenik untuk memperoleh mutan putatif yang memiliki toleransi terhadap suhu tinggi. Eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang dikulturkan pada media MS yang mengandung 30 g L⁻¹ sukrosa, 2 g L⁻¹ gelrite, 2 mg L⁻¹ 2.4D dan 1 mg L⁻¹ picloram. Kultur diinkubasi di ruang kultur selama 6 minggu pada suhu 20±4 °C. Pengujian radiosensitivitas menggunakan lima dosis iradiasi (10, 20, 30, 40 dan 50 Gy). Nilai radiosensitivitas yang diperoleh bervariasi antara setiap varietas, LD₂₀: 7.79 to 18.96 Gy dan LD₅₀: 24.29-33.63 Gy. Rancangan yang digunakan untuk seleksi suhu tinggi adalah rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama adalah suhu seleksi yang terdiri dari tiga taraf (25, 30 dan 35 °C) dan faktor kedua adalah dosis iradiasi sinar gamma yang terdiri atas tiga taraf (10, 20 dan 30 Gy). Kultur diinkubasi sesuai suhu seleksi yang digunakan selama 4 minggu. Selayar merupakan varietas yang memiliki nilai sensitivitas paling tinggi dibandingkan Dewata dan Nias. Meningkatnya dosis iradiasi dan suhu menurunkan daya hidup kalus embriogenik, jumlah embrio, dan persentase planlet yang berkecambah. Berdasarkan seleksi in vitro menggunakan suhu tinggi (25, 30, dan 35 °C) diperoleh 19 mutan putatif yang berasal dari embrio yang muncul pada permukaan kalus embriogenik yang bertahan hidup setelah dilakukan iradiasi dan seleksi suhu tinggi.

Kata kunci: embrio somatik, mutan putatif, radiosensitivitas, seleksi in vitro

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: nkhumaida@yahoo.com

PENDAHULUAN

Gandum (*Triticum aestivum* L.) merupakan salah satu tanaman pangan utama yang ditanam hampir di seluruh dunia. Luas penanaman gandum mencakup sekitar 30% area penanaman sereal di dunia, dengan lebih dari 220 juta ha areal budidaya (Cossani dan Reynolds, 2012). Kebutuhan gandum di Indonesia sangat tinggi, hal ini ditunjukkan oleh tingginya impor pada tahun 2012 mencapai 6,300,000 ton (BPS, 2013) setara dengan nilai US\$ 298,516,200 (Kemenperin, 2013). Berbagai persoalan dihadapi dalam pengembangan gandum di Indonesia di antaranya, terbatasnya varietas yang beradaptasi terhadap lingkungan tropis. Di daerah asalnya gandum dibudidayakan pada suhu 8-10 °C dan menghendaki suhu 10-21 °C sebagai suhu optimal untuk pertumbuhan (Fischer dan Maurer, 1978), persaingan lahan penanaman gandum di dataran tinggi dengan tanaman hortikultura, selain itu terjadinya perubahan iklim global yang sangat berpengaruh pada berbagai aspek pertanian dan lingkungan seperti peningkatan polusi udara, meningkatnya tingkat radiasi UV, perubahan curah hujan, ketidakaturan musim, kehilangan air dan pemanasan global yang menyebabkan peningkatan suhu juga menghambat pengembangan gandum di Indonesia. Peningkatan suhu sekitar 1.8 sampai 5.8 °C diprediksi akan terjadi diakhir abad ini (IPCC, 2007).

Berbagai upaya pemuliaan harus dilakukan untuk meningkatkan toleransi tanaman gandum terhadap cekaman lingkungan abiotik seperti peningkatan suhu melalui perbaikan genetik. Eksploitasi keragaman genetik melalui induksi mutasi adalah salah satu cara yang dibutuhkan pada program pemuliaan tanaman dalam mengembangkan varietas tanaman yang memiliki keunggulan karakter tertentu. Tujuan dari induksi mutasi adalah untuk meningkatkan laju frekuensi mutasi sehingga diperoleh varian dengan tingkat keragaman yang tinggi yang akan diseleksi sesuai dengan karakter yang diinginkan. Induksi mutasi dapat dilakukan dengan menggunakan mutagen kimia dan fisik. Iradiasi sinar gamma merupakan salah satu jenis mutagen fisik yang biasa digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik pada berbagai tanaman. Perlakuan mutagen akan merusak DNA dan selama proses perbaikan DNA akan terjadi mutasi baru yang diinduksi secara acak. Perubahan dapat terjadi pada organel di sitoplasma maupun mutasi kromosom inti (Jain, 2010).

Tingkat sensitivitas terhadap radiasi dapat diukur berdasarkan nilai LD₅₀ (*lethal dose 50*) yaitu dosis yang menyebabkan kematian 50% dari populasi tanaman yang diradiasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dosis optimum yang dapat menghasilkan mutan terbanyak umumnya diperoleh di sekitar LD₅₀ (Shu *et al.*, 2012). Nilai LD₅₀ sangat dipengaruhi oleh jenis tanaman, varietas, kandungan air dan oksigen. Penelitian yang dilakukan oleh Puchooa (2005) mengenai iradiasi sinar gamma pada kalus tanaman *Anthurium* menyatakan LD₅₀ diperoleh pada dosis iradiasi 15 Gy. Ling *et al.* (2008) menyatakan LD₅₀ pada kalus jeruk sekitar 27 Gy sedangkan hasil penelitian Mahadevamma *et al.* (2012) menunjukkan pada kalus pepaya sekitar 30 Gy.

Induksi mutasi mampu menghasilkan mutan dengan tingkat keragaman pada banyak karakter yang bisa diseleksi, sementara dengan pendekatan transgenik hanya satu karakter yang bisa diintegrasikan kedalam genom tanaman. Pendekatan transgenik juga memiliki kekurangan dalam hal regulasi dan penerimaan tanaman hasil rekayasa genetika. Keuntungan spesifik dari mutasi induksi adalah untuk mengembangkan galur mutan yang kemudian diidentifikasi karakter gen spesifiknya dalam rangka membangun *database* gen, untuk studi molekular yang berkaitan dengan fungsi genomik, pengembangan bioinformatika dan untuk pengembangan varietas yang dapat tumbuh pada lahan pertanian di bawah kondisi perubahan iklim (Jain, 2010).

Iradiasi sinar gamma telah banyak digunakan pada berbagai tanaman dalam rangka peningkatan keragaman genetik untuk toleransi cekaman abiotik dan biotik serta peningkatan kuantitas dan kualitas hasil, diantaranya: tomat (Ishfaq *et al.*, 2012), wortel (Nagananda *et al.*, 2013), kentang (Ahmad *et al.*, 2010), kedelai (Alify *et al.*, 2013), padi (Shanthi *et al.*, 2010), sorghum (Soeranto dan Sihono, 2010), dan gandum (Singh dan Balyan, 2009; Borzouei *et al.*, 2010; Plamenov *et al.*, 2013). Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan nilai radiosensitivitas sebagai dasar untuk melakukan induksi mutasi menggunakan iradiasi sinar gamma untuk memperoleh mutan putatif gandum yang memiliki toleransi terhadap suhu tinggi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan 3 Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor mulai bulan November 2013 sampai dengan Juli 2014. Iradiasi sinar gamma dilakukan di Pusat Aplikasi Tenaga Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional (PATIR BATAN). Eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik dari tiga varietas gandum yaitu Dewata, Selayar dan Nias.

Penentuan Nilai Radiosensitivitas Iradiasi Sinar Gamma Kalus Embriogenik Gandum Varietas Dewata, Nias dan Selayar

Percobaan ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap dengan perlakuan dosis iradiasi sinar gamma yang terdiri dari lima taraf yaitu: 10, 20, 30, 40 dan 50 Gy. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh 25 satuan percobaan dan setiap satuan percobaan dikulturkan 4 *clump* kalus embriogenik dengan ukuran 1 cm x 1 cm pada media MS dengan penambahan 30 g L⁻¹ sukrosa, 2 g L⁻¹ gelrite, 2 mg L⁻¹ 2.4D dan 1 mg L⁻¹ picloram. Kultur dipelihara di ruang kultur selama 6 minggu pada suhu 20±4 °C. Pengamatan yang dilakukan meliputi: penambahan diameter dan bobot kalus embriogenik serta nilai radiosensitivitas (LD₂₀ dan LD₅₀). Nilai radiosensitivitas diperoleh berdasarkan kombinasi data skoring perubahan warna (data tidak disampaikan), penambahan diameter dan bobot kalus embriogenik yang mencerminkan persentase kalus yang bertahan hidup.

Induksi Mutasi Sinar Gamma dan Seleksi In Vitro Kalus Embriogenik Gandum terhadap Cekaman Suhu Tinggi

Percobaan ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama yaitu suhu seleksi yang terdiri dari tiga taraf (25, 30, dan 35 °C). Faktor ke dua adalah dosis iradiasi diantara LD₂₀ dan LD₅₀ yang terdiri atas tiga taraf (10, 20, dan 30 Gy). Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 10 kali, sehingga diperoleh 90 satuan percobaan dan setiap satuan percobaan dikulturkan 5 *clump* kalus embriogenik dengan ukuran 1 cm x 1 cm pada media MS dengan penambahan 30 g L⁻¹ sukrosa, 2 g L⁻¹ gelrite, 2 mg L⁻¹ 2.4D dan 1 mg L⁻¹ picloram. Kultur dipelihara selama 4 minggu sampai dihasilkan embrio somatik. Perkecambahan embrio somatik menggunakan media MS₀ (MS tanpa ZPT) dan dipelihara selama 4 minggu hingga terbentuk planlet. Pengamatan yang dilakukan meliputi: penambahan bobot dan diameter kalus embriogenik, persentase dan jumlah kalus embriogenik yang bertahan hidup, jumlah embrio somatik, serta persentase perkecambahan planlet normal.

Analisis Data

Data penambahan bobot dan diameter kalus embriogenik dianalisis secara statistik menggunakan program SAS 9.1, sedangkan penentuan nilai radiosensitivitasnya menggunakan program *Curve expert* 32. Nilai rata-rata dihitung dan dibandingkan menggunakan uji selang berganda duncan (DMRT) pada taraf 5% (p<0.05)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Nilai Radiosensitivitas Iradiasi Sinar Gamma Kalus Embriogenik Gandum Varietas Dewata, Nias dan Selayar

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengetahui tingkat radiosensitivitas suatu tanaman terhadap iradiasi sinar gamma adalah dengan mengetahui *Lethal Doses* (LD₂₀ dan LD₅₀) dari tanaman tersebut (Rakotoarisoa *et al.*, 2008). Perubahan warna, penambahan bobot dan diameter kalus dapat digunakan untuk menduga nilai radiosensitivitas pada kalus embriogenik gandum. Penambahan diameter dan bobot kalus embriogenik mengalami penurunan

seiring meningkatnya dosis iradiasi pada semua varietas yang digunakan (Tabel 1). Iradiasi dosis tinggi diduga menyebabkan kerusakan pada organel-organel di dalam sel. Kerusakan tersebut mempengaruhi fungsi fisiologis dan biokimia dalam metabolisme sel sehingga terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan sel.

Kalus yang tumbuh dan bertahan hidup umumnya berwarna putih kekuningan, sedangkan kalus yang berwarna kecokelatan hingga menghitam selnya diduga mengalami kematian. Iradiasi gamma dosis rendah mampu memicu pertumbuhan dan menstimulasi perubahan fisiologis tanaman, sedangkan pada dosis yang tinggi akan menghasilkan radikal bebas dalam bentuk hidroksil. Radikal hidroksil/ hidrogen peroksida akan menyebabkan kerusakan fisiologis berupa terhambatnya proses pembelahan dan diferensiasi sel dan kerusakan gen jika radikal hidroksil tersebut menempel pada rantai nukleotida yang menyebabkan rusaknya DNA (Suharsono *et al.*, 2009).

Nilai LD₂₀ dan LD₅₀ yang diperoleh bervariasi antar varietas gandum (Tabel 2). Varietas Selayar menunjukkan tingkat sensitivitas iradiasi sinar gamma yang lebih tinggi dengan nilai radiosensitivitas berkisar antara 7.79-24.29 Gy. Hal ini mengindikasikan bahwa sel pada varietas Selayar lebih mudah mengalami kerusakan akibat iradiasi dibandingkan kedua varietas lain yang memerlukan iradiasi lebih tinggi untuk mendapatkan nilai LD₂₀ dan LD₅₀. Faktor fisik, biologi dan fisiologi mempengaruhi sensitivitas tanaman, di antaranya: faktor genotipe, tanaman yang memiliki jumlah kromosom lebih banyak mempunyai sensitivitas lebih tinggi dibanding tanaman yang memiliki jumlah kromosom yang lebih sedikit, fase perkembangan sel, saat fase pembelahan akan lebih peka dibanding pada fase istirahat (*resting*), dan umur jaringan. Nilai radiosensitivitas tanaman juga berkaitan erat dengan kandungan air di dalam sel tanaman (Herison *et al.*, 2008).

Induksi Mutasi Sinar Gamma dan Seleksi In Vitro Kalus Embriogenik Gandum terhadap Cekaman Suhu Tinggi

Seleksi *in vitro* toleransi terhadap cekaman suhu tinggi pada kalus embriogenik yang telah diradiasi sinar gamma dilakukan pada inkubator yang suhunya diatur pada suhu 25, 30 dan 35 °C. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma dan perlakuan suhu seleksi

Tabel 1. Penambahan diameter dan bobot kalus embriogenik gandum selama 6 minggu pada uji radiosensitivitas

| Iradiasi (Gy) | Penambahan diameter (mm) | | | Penambahan bobot (mg) | | |
|---------------|--------------------------|--------|---------|-----------------------|---------|----------|
| | Dewata | Nias | Selayar | Dewata | Nias | Selayar |
| 10 | 3.18a | 2.71a | 2.51 | 226.40a | 297.60a | 234.58a |
| 20 | 2.86b | 2.55ab | 2.42 | 201.80a | 172.64b | 201.48a |
| 30 | 2.86b | 2.53ab | 2.37 | 148.80ab | 128.00b | 135.64ab |
| 40 | 2.82b | 2.30b | 2.40 | 60.80c | 82.30b | 94.12b |
| 50 | 2.39c | 2.45ab | 2.28 | 76.20bc | 64.20b | 79.70b |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%

Tabel 2. Nilai radiosensitivitas (LD₂₀ dan LD₅₀) pada kalus embriogenik gandum

| Varietas | Tipe Grafik | Persamaan | LD ₂₀ (Gy) | LD ₅₀ (Gy) |
|----------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Dewata | <i>Polynomial fit</i> | $y = a+bx+cx^2+dx^3$ | 18.96 | 33.63 |
| Nias | <i>Polynomial fit</i> | $y = a+bx+cx^2+dx^3$ | 13.52 | 33.05 |
| Selayar | <i>Exponential fit</i> | $y = ae^{(bx)}$ | 7.79 | 24.29 |

Keterangan: Nilai radiosensitivitas menggunakan iradiasi sinar gamma pada energi 638.7409 Ci

secara tunggal memberikan pengaruh yang nyata terhadap penambahan diameter kalus embriogenik selama empat minggu inkubasi pada semua varietas. Rata-rata penambahan diameter menurun seiring dengan peningkatan dosis iradiasi, yaitu pada varietas Dewata berkisar 1.01-1.76 mm, pada varietas Nias berkisar 0.73-1.34 mm, sedangkan pada varietas Selayar berkisar 0.46-1.17 mm. Perlakuan suhu tinggi yang semakin meningkat juga menurunkan rata-rata penambahan diameter, yaitu pada varietas Dewata berkisar 1.08-1.67 mm, pada varietas Nias berkisar 0.62-1.42 mm, sedangkan pada varietas Selayar berkisar 0.60-1.12 mm (Tabel 3). Data menunjukkan bahwa rata-rata penambahan diameter varietas Dewata cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kedua varietas lain pada semua perlakuan iradiasi dan suhu seleksi, hal ini diduga varietas Dewata memiliki tingkat toleransi cekaman suhu tinggi lebih baik dibandingkan varietas lain, atau diduga pada sel-sel kalus embriogenik yang telah diradiasi pada varietas Dewata telah mampu menginduksi gen dan aktifnya mekanisme ketahanan terhadap cekaman suhu tinggi. Perlakuan suhu memberikan

pengaruh yang nyata terhadap rata-rata penambahan bobot kalus embriogenik pada semua varietas. Penambahan bobot akibat iradiasi menurun seiring meningkatnya dosis iradiasi, yaitu pada varietas Dewata berkisar 103.4-137.4 mg, pada varietas Nias berkisar 117.09-140.51 mg, sedangkan pada varietas Selayar berkisar 54.13-125.91 mg. Perlakuan suhu yang semakin meningkat juga menurunkan rata-rata penambahan bobot kalus embriogenik, yaitu pada varietas Dewata berkisar 78.67-177.20 mg, pada varietas Nias berkisar 86.69-212.01 mg sedangkan pada varietas Selayar berkisar 59.01-146.80 mg (Tabel 4).

Peningkatan dosis iradiasi dan suhu menyebabkan perubahan warna dan penghambatan pertumbuhan kalus embriogenik. Kondisi tersebut menunjukkan terjadinya kematian sel-sel di sekitarnya melalui *programmed cell death* (PCD). Menurut van Doorn *et al.* (2011), PCD merupakan bagian integral dari perkembangan tanaman selama morfogenesis jaringan, organ, atau embrio yang disebabkan oleh rusaknya vakuola atau sebagai respon terhadap stres biotik dan abiotik yang menyebabkan terjadinya nekrosis.

Tabel 3. Penambahan diameter (mm) kalus embriogenik gandum selama 4 minggu setelah iradiasi sinar gamma dan seleksi *in vitro* pada suhu 25 °C, 30 °C, dan 35 °C

| Iradiasi (Gray) | Penambahan diameter (mm) | | | Rata-rata (mm) |
|-----------------|--------------------------|--------|-------|----------------|
| | 25 °C | 30 °C | 35 °C | |
| Dewata | | | | |
| 10 | 2.05 | 1.60 | 1.62 | 1.76a |
| 20 | 1.64 | 1.03 | 0.88 | 1.18b |
| 30 | 1.32 | 0.98 | 0.74 | 1.01b |
| Rata-rata | 1.67A | 1.20AB | 1.08B | |
| Nias | | | | |
| 10 | 1.65 | 1.43 | 0.93 | 1.34a |
| 20 | 1.51 | 1.37 | 0.57 | 1.15a |
| 30 | 1.10 | 0.75 | 0.35 | 0.73b |
| Rata-rata | 1.42A | 1.18A | 0.62B | |
| Selayar | | | | |
| 10 | 1.45 | 1.20 | 0.85 | 1.17a |
| 20 | 1.28 | 1.39 | 0.64 | 1.10a |
| 30 | 0.62 | 0.47 | 0.30 | 0.46b |
| Rata-rata | 1.12A | 1.02A | 0.60B | |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%. Varietas bukan sebagai faktor perlakuan

Tabel 4. Penambahan bobot (mg) kalus embriogenik gandum selama 4 minggu setelah iradiasi sinar gamma dan seleksi *in vitro* pada suhu 25 °C, 30 °C, dan 35 °C

| Iradiasi (Gy) | Penambahan bobot (mg) | | | Rata-rata (mg) |
|----------------|-----------------------|--------|--------|----------------|
| | 25 °C | 30 °C | 35 °C | |
| Dewata | | | | |
| 10 | 209.81 | 109.60 | 92.80 | 137.40 |
| 20 | 167.42 | 90.00 | 72.03 | 109.81 |
| 30 | 154.40 | 84.60 | 71.20 | 103.40 |
| Rata-rata | 177.21A | 94.73B | 78.67B | |
| Nias | | | | |
| 10 | 222.52 | 113.48 | 85.52 | 140.51 |
| 20 | 218.14 | 80.88 | 95.62 | 131.55 |
| 30 | 195.36 | 76.96 | 78.94 | 117.09 |
| Rata-rata | 212.01A | 90.44B | 86.69B | |
| Selayar | | | | |
| 10 | 230.38 | 77.94 | 69.4 | 125.91a |
| 20 | 152.24 | 72.92 | 54.86 | 93.34ab |
| 30 | 57.78 | 51.82 | 52.78 | 54.13b |
| Rata-rata | 146.80A | 67.56B | 59.01B | |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%. Varietas bukan sebagai faktor perlakuan.

Persentase daya hidup kalus embriogenik sangat rendah dengan meningkatnya dosis iradiasi dan suhu seleksi. Persentase daya hidup kalus embriogenik pada varietas Dewata berkisar 34.0-70.0%, Nias berkisar 36.0-76.0% dan Selayar berkisar 0.0-56.0% (Tabel 5). Varietas Selayar menunjukkan daya hidup kalus embriogenik paling rendah, mengindikasikan bahwa tingkat sensitivitas varietas Selayar

terhadap iradiasi dan suhu tinggi lebih besar dibandingkan varietas lainnya. Kalus embriogenik yang bertahan hidup dan berdiferensiasi pada kondisi suhu tinggi tersebut diduga sebagai kandidat mutan yang toleran terhadap cekaman suhu tinggi. Rostika *et al.* (2013) menyatakan bahwa iradiasi dosis rendah (1-5 krad) dan perlakuan suhu hingga 25 °C dan 30 °C pada kalus purwoceng mampu menstimulir

Tabel 5. Persentase (%) kalus embriogenik yang bertahan hidup selama 4 minggu setelah iradiasi sinar gamma pada suhu 25 °C, 30 °C, dan 35 °C

| Iradiasi (Gy) | Jumlah kalus ditanam | Persentase kalus | | |
|----------------|----------------------|------------------|---------|---------|
| | | 25 °C | 30 °C | 35 °C |
| Dewata | | | | |
| 10 | 50 | 58 (29) | 70 (35) | 60 (30) |
| 20 | 50 | 54 (27) | 38 (19) | 36 (18) |
| 30 | 50 | 50 (25) | 44 (22) | 34 (17) |
| Nias | | | | |
| 10 | 25 | 76 (19) | 68 (17) | 68 (17) |
| 20 | 25 | 72 (18) | 76 (19) | 60 (15) |
| 30 | 25 | 60 (15) | 44 (11) | 36 (9) |
| Selayar | | | | |
| 10 | 25 | 56 (14) | 40 (10) | 44 (11) |
| 20 | 25 | 36 (9) | 28 (7) | 12 (3) |
| 30 | 25 | 24 (6) | 16 (4) | 0 (0) |

Keterangan: Angka di dalam kurung merupakan jumlah total kalus hidup

terbentuknya embrio somatik, tetapi hanya embrio somatik pada suhu 25 °C yang mampu beregenerasi menjadi *planlet*. *Planlet* yang dihasilkan diduga sebagai mutan putatif yang toleran terhadap suhu tinggi.

Daya hidup sel pada kalus embriogenik juga diduga sangat dipengaruhi oleh kandungan antioksidan yang terbentuk saat iradiasi dan seleksi pada suhu tinggi pada setiap varietas. Antioksidan diperlukan dalam mekanisme detoksifikasi penanganan radikal bebas yang dihasilkan ketika terpapar iradiasi sinar gamma dan akibat tercekam suhu tinggi. Kandungan antioksidan yang berbeda pada setiap varietas mempengaruhi ketahanan terhadap radikal bebas yang dihasilkan seperti ROS (*reactif oxygen species*) dan hidrogen peroksida. Sistem pertahanan terhadap radikal bebas melibatkan sistem enzimatis maupun non enzimatis. Sistem antioksidan enzimatis seperti *ascorbat peroksidase*, *dehidroaskorbat reduktase*, *glutathione S-transferase*, *superoksida dismutase*, *catalase*, *guaicol peroksidase*, *glutathione reduktase*, sedangkan antioksidan non enzimatis seperti *glutathione*, *ascorbat* dan *tokophenol*. Sel yang memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi biasanya akan lebih bisa bertahan saat kandungan radikal bebas di dalam sel meningkat (Wahid *et al.*, 2007).

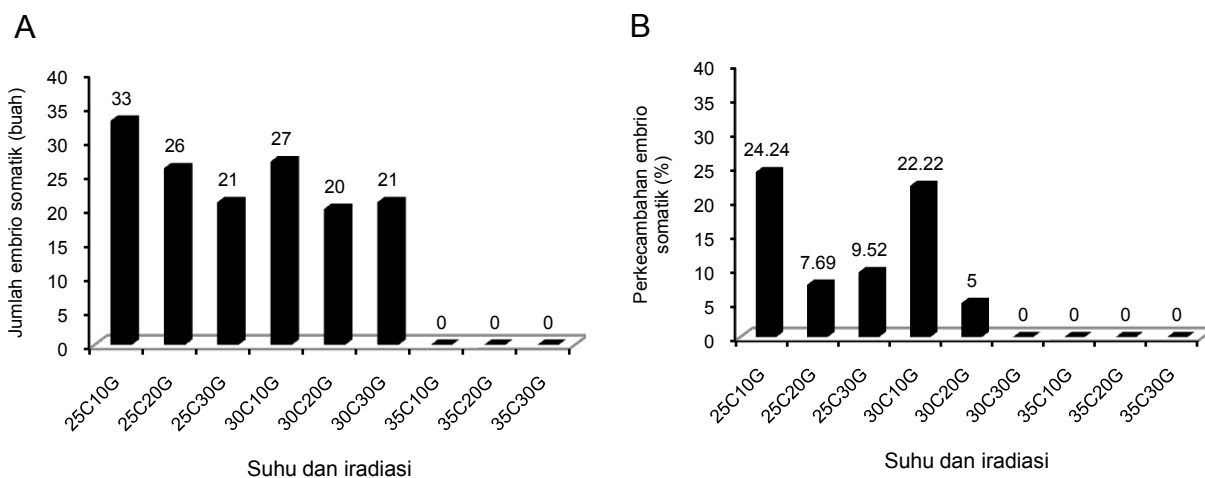
Kalus embriogenik yang bertahan hidup seharusnya mampu menghasilkan sejumlah embrio somatik yang dapat dikembangbiakan menjadi *planlet* sebagai mutan putatif toleran suhu tinggi. Penelitian ini menunjukkan bahwa hanya kalus embriogenik dari varietas Dewata yang mampu menghasilkan embrio somatik dengan persentase perkecambahan *planlet* normal yang rendah berkisar 5.0% pada iradiasi 20 Gy dan suhu 30 °C hingga 24.24% pada iradiasi 10 Gy dan suhu 25 °C (Gambar 1). Rendahnya persentase perkecambahan embrio somatik membentuk *planlet* diduga akibat perlakuan iradiasi dan suhu menyebabkan terjadinya kerusakan organel di dalam sel embrio somatik yang berpengaruh terhadap aktifitas metabolisme. Hasil ini berbeda dengan yang dikemukakan oleh Rostika *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa peningkatan dosis iradiasi hingga 5 Krad/50 Gy

mampu menstimulir munculnya embrio somatik lebih banyak dibandingkan dosis rendah, bahkan iradiasi dosis tinggi mampu memicu pendewasaan embrio somatik melalui penghambatan pertumbuhan proliferasi kalus. Hal ini diduga dosis iradiasi yang tinggi mampu mengubah rasio fitohormon auksin dan sitokinin sehingga mengubah pola diferensiasi sel.

Aplikasi iradiasi sinar gamma dosis rendah pada kalus embriogenik varietas Dewata yang dilanjutkan dengan seleksi *in vitro* ketahanan terhadap suhu tinggi mampu menghasilkan sejumlah *planlet* yang berkecambah, walaupun banyak embrio somatik yang berkecambah abnormal yang dapat dilihat dari banyaknya jumlah akar yang dihasilkan tetapi pertumbuhan tunas terhambat. Menurut Shu *et al.* (2012), perubahan fisiologis dan genetik dapat diekspresikan dengan adanya perubahan penampilan fenotipik mutan yang bervariasi. Umumnya ukuran mutan hasil induksi mutasi akan lebih pendek dengan ukuran daun kecil, bahkan ada tunas albino yang muncul. Pada generasi selanjutnya, kerusakan fisiologis berangsur pulih. Sel-sel yang mengalami kerusakan mengalami *recovery*, sedangkan gen termutasi dapat diwariskan pada generasi berikutnya.

Hasil perkecambahan embrio somatik hanya menghasilkan 19 *planlet* mutan putatif dari varietas Dewata (Tabel 6) yang memiliki morfologi normal dengan daun dan akar sempurna (Gambar 2). Beberapa *planlet* mengalami pemudaran warna daun dan terhambatnya pertumbuhan. Pemudaran warna daun tersebut diduga akibat terjadi kerusakan pada kloroplas sehingga berdampak pada produksi klorofil. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hasbullah *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa iradiasi sinar gamma dosis 40-60 Gy menyebabkan kerusakan pada kloroplas yang ditandai terjadinya nekrosis dan albino pada daun tanaman *Gerbera jamesonii*.

Planlet varietas Dewata yang dihasilkan pada percobaan ini diharapkan menjadi mutan putatif yang toleran dan adaptif terhadap suhu tinggi. Varian yang terjadi diharapkan bukan disebabkan oleh epigenetik melainkan

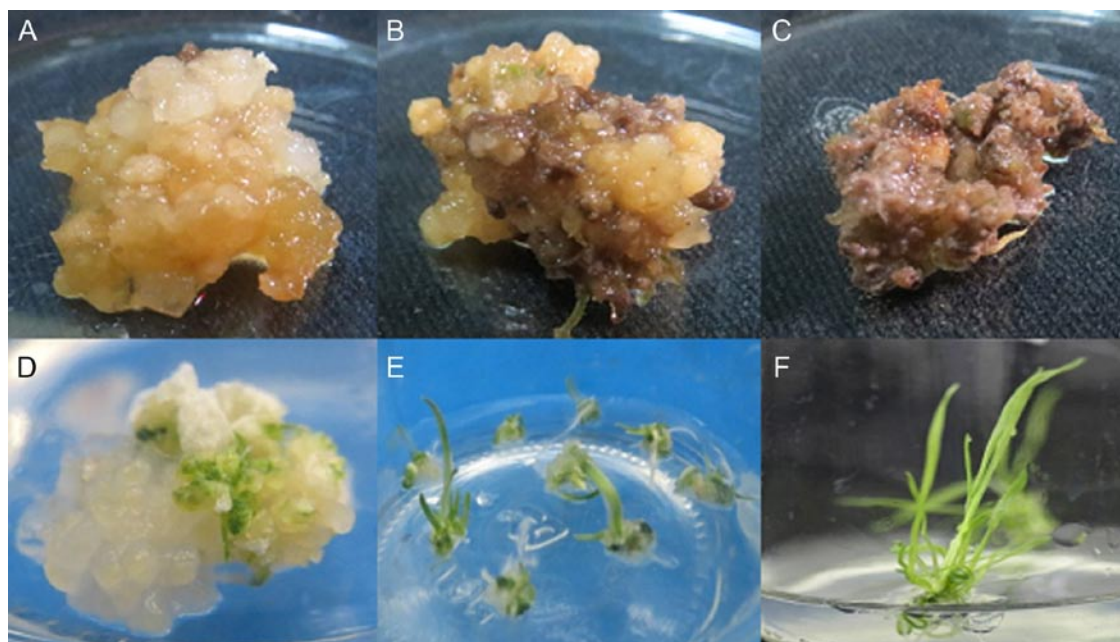


Gambar 1. Jumlah embrio somatik (A), persentase perkecambahan embrio somatik setelah iradiasi dan pengujian suhu tinggi varietas Dewata (B)

Tabel 6. Karakteristik mutan putatif toleran suhu tinggi pada varietas Dewata

| Kode mutan | Tinggi <i>planlet</i> (cm) | Jumlah daun (helai) | Warna daun |
|------------|----------------------------|---------------------|-----------------|
| 10GY25C-1 | 20.3 | 6 | Hijau muda |
| 10GY25C-2 | 16.5 | 5 | Hijau muda |
| 10GY25C-3 | 17.0 | 5 | Hijau muda |
| 10GY25C-4 | 17.5 | 6 | Hijau tua |
| 10GY25C-4 | 19.7 | 6 | Hijau tua |
| 10GY25C-5 | 20.0 | 6 | Hijau muda |
| 10GY25C-6 | 15.5 | 5 | Hijau tua |
| 10GY25C-7 | 17.5 | 6 | Hijau muda |
| 20GY25C-1 | 18.6 | 5 | Hijau muda |
| 20GY25C-2 | 15.5 | 4 | Hijau muda |
| 30GY25C-1 | 16.5 | 5 | Hijau keputihan |
| 30GY25C-2 | 17.3 | 5 | Hijau keputihan |
| 10GY30C-1 | 22.0 | 5 | Hijau keputihan |
| 10GY30C-2 | 13.5 | 5 | Hijau keputihan |
| 10GY30C-3 | 21.0 | 6 | Hijau tua |
| 10GY30C-4 | 18.0 | 5 | Hijau tua |
| 10GY30C-5 | 18.5 | 5 | Hijau muda |
| 10GY30C-6 | 19.0 | 5 | Hijau muda |
| 20GY30C-1 | 14.5 | 4 | Hijau keputihan |

Keterangan: Kode mutan putatif mengikuti dosis iradiasi dan agen seleksi cekaman suhu tinggi



Gambar 2. Morfologi kalus dan perkecambahan. Suhu 25 °C (A); 30 °C (B); 35 °C (C); kalus embriogenik yang menghasilkan embrio somatik (D); perkecambahan embrio somatik (E); *planlet* mutan putatif (F)

terbentuk sebagai hasil mutasi sehingga ketahanannya bersifat permanen dan dapat diwariskan. Menurut Plamenov *et al.* (2013) varian yang disebabkan oleh epigenetik tidak bersifat permanen dan tidak dapat diwariskan pada

keturunan. Suhu tinggi pada seleksi *in vitro* tidak hanya berfungsi sebagai agen penyeleksi tetapi juga dapat menginduksi terjadinya mutasi selektif atau mutasi terarah sehingga dihasilkan varian yang diinginkan.

KESIMPULAN

Nilai radiosensitivitas kalus embriogenik antar varietas gandum sangat bervariasi, LD₂₀: 7.79 to 18.96 Gy dan LD₅₀: 24.29-33.63 Gy. Semakin tinggi dosis iradiasi sinar gamma menyebabkan diameter dan bobot kalus embriogenik semakin rendah, warna kalus menjadi kecoklatan hingga menghitam; hal ini diduga terjadi akibat adanya kerusakan sel pada kalus. Secara umum suhu tinggi dan iradiasi sinar gamma menurunkan daya hidup kalus, menghambat munculnya embrio somatik serta menurunkan daya berkecambah embrio somatik menjadi planlet. Percobaan yang dilakukan mampu menghasilkan 19 *planlet* mutan putatif dari varietas Dewata yang diduga memiliki toleransi terhadap suhu tinggi. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk aklimatisasi dan evaluasi *planlet* mutan putatif toleran suhu tinggi yang telah dihasilkan.

TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada DIKTI atas Hibah Pascasarjana 2012-2014, biaya penelitian Beasiswa Unggulan DIKTI 2012-2014, Pusat Aplikasi Tenaga Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (PATIR BATAN).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., I.A. Nasir, M.S. Haider, M.A. Javed, M.A. Javed, Z. Latif, T. Husnain. 2010. In vitro induction of mutation in potato cultivar. Pak. J. Phytopathol. 22:51-57.
- Alify, A.M.R., M.M. Rashed, A.M. Ebstam, H.S. Elbeltagi. 2013. Effect of gamma radiation on the lipid profiles soybean, peanut, dan sasame seed oils. Grasas. Y. Aceites. 64:256-368.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. Data impor gandum Indonesia 2012. <http://www.bps.go.id> [30 Juni 2014].
- Borzouei, A., M. Kafi, H. Khazaei, B. Naseryan, A. Majdabadi. 2010. Effect of gamma radiation on germination and physiological of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Pak. J. Bot. 42:2281-2290.
- Cossani, C.M., M.P. Reynolds. 2012. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. Plant Physiol. 160:1710-1718.
- Fischer, R.A., R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars, grain yield response. Aust. J. Agric. 29:897-912.
- Hasbullah, N.A., R.M. Taha, A. Saleh, N. Mahmud. 2012. Irradiation effect on *in vitro* organogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. Horticultura Brasileira 30:252-257.
- Herison, C., Rustikawati, H.S. Sujono, I.A. Syarifah. 2008. Induksi mutasi melalui sinar gamma terhadap benih untuk meningkatkan keragaman populasi dasar jagung (*Zea mays* L.). Akta Agrosia 11:57-62.
- [IPCC] Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report Climate Change. Syntesis Report World Meteorological Organization. Geneva. Switzerland.
- Ishfaq, M., I.A. Nasir, N. Mahmood, M. Saleem. 2012. In vitro induction of mutation in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cv Roma by using chemical mutagen. Pak. J. Bot. 44:311-314.
- Jain, M.S. 2010. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. Rom. Biotechnol. Lett. 15:88-106.
- [Kemenperin] Kementerian Perindustrian Republik Indonesia. 2013. Pemantauan impor kelompok hasil industri makanan dan minuman. <http://www.kemenperin.go.id> [20 Maret 2013].
- Ling, A.P.K., J.Y. Chia, S. Hussein, A.R. Harun. 2008. Physiological response of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. World Appl. Sci. J. 5:12-19.
- Mahadevamma, M., L. Sahijram, V. Kumari, T.H. Shankarappa. 2012. In vitro mutation studies in papaya (*Carica papaya* L.). J. Biotechnol. 1:49-55.
- Nagananda, G.S., S. Rajath, D. Agarwal, K.R. Mathew, S.S. Rajan. 2013. Induced mutation in callus cell line of *Daucus carota* L. Asian J. Plant Sci. 12:46-50.
- Plamenov, D., I. Beichev, N. Daskalova, D. Spetson, T. Moraliyski. 2013. Application of a low dose of gamma rays in wheat androgenesis. Arch. Biol. Sci. 65:291-296.
- Puchooa, D. 2005. In vitro mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. Int. J. Agri. Biol. 7:11-20.
- Rakotoarisoa, N.V., A. Andrianjaka, F.J. Zapataarias, R. Afza, C. Mba. 2008. Inducing cold tolerance in Malagasy rice varieties IR 58614, Malady and Rojofotsy through in vitro mutagenesis. Plant Mutat. Rep. 2:16-23.
- Rostika, I., I. Darwati, Yudiwanti. 2013. Peningkatan keragaman genetik purwoceng melalui iradiasi sinar gamma dan seleksi in vitro. J. Litri 19:88-98.

- Shanthi, D., S. Jebaraj, S. Geetha. 2010. In vitro screening for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Electronic J. of Plant Breeding* 1:1208-1212.
- Shu, Q.Y., B.P. Forster, H. Nakahawa. 2012. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CAB International and FAO. Wallingford. United Kingdom.
- Singh, N.K., H.S. Balyan. 2009. Induced mutation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Kharchia 65 for reduced plant height and improved grain quality traits. *Adv. Biol. Res.* 3:215-221.
- Soeranto, H., Sihono. 2010. Sorghum breeding for improved drought tolerance using induced mutation with gamma irradiation. *J. Agron. Indonesia* 38:95-99.
- Suharsono, M. Alwi, A. Purwito. 2009. Pembentukan tanaman cabai haploid melalui induksi ginogenesis dengan menggunakan serbuk sari yang diradiasi sinar gamma. *J. Agron. Indonesia* 37:123-129.
- van Doorn, W.G., E.P. Beers, J.L. Dangel, V.E. Franklinton, P. Gallois, I.H. Nishimura, A.M. Jones, K. Yamada, E.J. Lam, I.A.J. Mundy, M. Mur, A. Petersen, M. Smertenko, F. Taliansky, T. Van Breusegem, E. Wolpert, B. Woltering, Zhivotovsky, P.V. Bozhkov. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 1:1-6.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61:199-223.