

PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA TERHADAP REGENERASI KALUS JERUK SIAM HASIL KULTUR PROTOPLAS

Aida Wulansari^{1,*}, Agus Purwito², Ali Husni³ dan Enny Sudarmonowati¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI

Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor, 16911

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB

Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³Balai Besar Penelitian & Pengembangan Bioteknologi & Sumberdaya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Cimanggu, Bogor 16111

Corresponding author: aida_wulansari@yahoo.com

Abstract

Tangerine cv. Siam has a quite sweet flavour, easily peeled skin, fragrant, soft and juicy flesh. But still has relatively many seeds (15-20 seeds per fruit) and the skin color that has not been so attractive, so it can not compete with citrus from other countries. Quality improvement of citrus fruit with little or no seeds is very important. The first step for improvement is to increase the genetic variability of citrus, so that the selection process becomes more efficient. Callus culture from protoplast has a high level of genetic variability. This study aimed to enhance the genetic variability of Tangerine cv. Siam by Gamma ray irradiation treatment on callus from protoplast culture. Calli irradiated at doses of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 Gray. Observation on the growth of callus showed variation in morphology and weight of callus. At lower doses (10-50 Gray) callus growth were not inhibited, but at higher doses (60-100 Gray) callus growth were very slow. Gamma ray irradiation also affects the formation of somatic embryos than other dose. After 4 weeks on media MW + 0.5 mg/l ABA, 50 Gray callus produced more somatic embryos than the other doses. Germination of somatic embryos from 50 Gray dose, produced more shoots than the other dose after 4 weeks on media MW + 0.5 mg/l GA₃.

Key words : Tangerine cv. Siam, protoplast, genetic variability, induced mutation

PENDAHULUAN

Tanaman hortikultura memberikan kontribusi yang cukup besar dalam kebutuhan pangan, peningkatan ekspor, peningkatan pendapatan petani dan pemenuhan gizi keluarga. Indonesia memiliki 323 komoditas hortikultura yang terdiri dari buah-buahan, sayuran, biofarmaka dan tanaman hias. Jeruk termasuk dalam 10 komoditas utama hortikultura yang telah ditetapkan Departemen Pertanian sejak tahun 2000. Tanaman jeruk sudah lama dibudidayakan di Indonesia dan di negara-negara tropis Asia lainnya. Jeruk dari Indonesia dan kawasan Asia sangat diminati oleh negara Eropa. Produksi jeruk Indonesia dalam 10 tahun terakhir meningkat sekitar 400 ribu ton per tahun (BPS, 2010). Kriteria jeruk yang digemari konsumen adalah buahnya memiliki biji sedikit atau tanpa biji (*seedless*), mudah dikupas, memiliki warna yang menarik atau *pigmented* (Spiegel-Roy and Goldschmidt 1996).

Di Indonesia pasar jeruk Siam lebih mendominasi dibandingkan jeruk yang lainnya. Jeruk Siam memiliki rasa yang cukup manis namun belum sesuai dengan kategori yang diinginkan pasar dunia untuk dikonsumsi dalam keadaan segar. Jeruk ini masih mempunyai biji yang relatif banyak (15-20 biji per buah) dan warna serta kulit yang belum begitu menarik, sehingga kalah bersaing dengan jeruk produk negara lain (Husni *et al.*, 2008).

Peningkatan kualitas jeruk yang sesuai dengan keinginan pasar dapat dilakukan dengan pemuliaan. Bahan dasar pemuliaan yang terpenting adalah keragaman genetik. Keragaman genetik yang luas pada karakter yang dikehendaki mengakibatkan program pemuliaan menjadi lebih efisien. Keragaman genetik dapat diperluas dengan berbagai cara, yaitu introduksi, eksplorasi, hibridisasi/persilangan, mutasi dan transformasi genetik.

Keragaman genetik dapat pula terjadi karena teknik kultur jaringan yang disebut variasi somaklonal. Kawata dan Oono (1998) menyatakan bahwa keragaman genetik lebih sering terjadi pada kultur protoplas dibandingkan teknik kultur *in vitro* yang lain. Bentuk variasi yang paling umum dijumpai pada tanaman hasil

regenerasi protoplas adalah poliploidisasi yang terjadi melalui proses endopoliploidisasi (penggandaan jumlah kromosom selama mitosis tanpa sitokinesis), fusi sel secara spontan atau regenerasi dari sel poliploid yang telah ada pada jaringan tanaman asal protoplas, dapat pula terjadi aneuploid yaitu tanaman yang memiliki jumlah kromosom yang bukan merupakan kelipatan dari jumlah kromosom dasar (Veilleux *et al.*, 2005).

Penggunaan mutagen fisik selama periode kultur jaringan, dapat meningkatkan keragaman genetik (Predieri, 2001). Peluang keberhasilan peningkatan variasi somaklonal pada kalus hasil kultur protoplas sangat tinggi, karena sistem regenerasi jeruk Siam melalui embriogenesis somatik telah berhasil dilakukan oleh Husni *et al.* (2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar Gamma terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus membentuk embrio somatik serta kemampuan embrio somatik berkecambah membentuk tanaman.

BAHAN DAN METODE

Penelitian *in vitro* dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Dep. AGH Faperta IPB, sedangkan untuk iradiasi sinar Gamma dilakukan di P3TIR BATAN Pasar Jumat, Jakarta.

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus embriogenik hasil kultur protoplas jeruk Siam Pontianak. Kalus yang berasal dari kultur protoplas tersebut telah berumur antara 4-5 tahun sejak inisiasi dan dilakukan subkultur setiap bulan untuk menjaga viabilitasnya. Media yang digunakan merupakan modifikasi MS (Murashige and Skoog), yaitu media MW (Husni, 2010). Zat pengatur tumbuh yang digunakan BAP, ABA dan GA₃.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu induksi mutasi dengan sinar Gamma dan regenerasi kalus hasil mutasi melalui jalur embriogenesis somatik. Dosis iradiasi sinar Gamma yang digunakan ada 11 taraf yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 Gray. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor. Tiap dosis diulang 10 kali. Peubah yang diamati pada tahap ini adalah berat kalus (gram) dan morfologi kalus. Perbedaan setiap perlakuan dianalisis menggunakan uji F pada taraf nyata 5%, apabila hasilnya berbeda nyata akan dilakukan uji lanjut DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5%.

Kalus hasil iradiasi sinar Gamma kemudian disubkultur ke media MW tanpa zat pengatur tumbuh untuk proliferasi kalus. Setelah 4 minggu kemudian kalus diregenerasikan melalui jalur embriogenesis somatik yang terdiri dari tahap pendewasaan embrio somatik dan tahap perkecambahan embrio somatik. Media yang digunakan pada tahap pendewasaan adalah media MW dengan penambahan 0,5 mg/l ABA sedangkan pada tahap perkecambahan digunakan media MW dengan penambahan 0.5 mg/l GA₃.

Peubah yang diamati pada tahap proliferasi kalus adalah morfologi (struktur dan warna kalus) serta berat kalus. Pada tahap pendewasaan, yang diamati adalah jumlah embrio somatik yang terbentuk, sedangkan pada tahap perkecambahan adalah jumlah bakal tunas yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

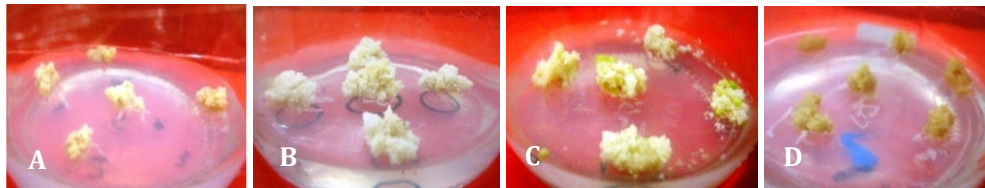
Keragaman pertumbuhan kalus pada berbagai taraf dosis dapat diamati pada minggu ke-4 setelah iradiasi sinar Gamma. Pengamatan morfologi kalus yang meliputi struktur dan warna kalus menunjukkan hasil yang bervariasi (Tabel 1). Struktur kalus setelah iradiasi, tidak terjadi perubahan, yaitu remah (*friable*), dan bersifat embriogenik. Secara umum, warna kalus sebelum iradiasi adalah putih kekuningan. Pengamatan 4 minggu setelah iradiasi menunjukkan adanya perubahan warna menjadi putih kehijauan pada beberapa dosis, yaitu dosis 20, 50 dan 90 Gray. Sedangkan pada dosis 70 Gray, warna kalus menjadi kecoklatan (Gambar 1). Kalus pada dosis 0, 10, 30, 40, 60, 80 dan 100 Gray tidak nampak adanya perubahan warna.

Kalus umur 4 minggu setelah iradiasi juga menunjukkan adanya perbedaan pertambahan beratnya. Apabila dibandingkan dengan kalus yang mendapat perlakuan iradiasi, maka kalus tanpa perlakuan iradiasi (kontrol) menunjukkan pertambahan berat tertinggi. Semakin tinggi dosis iradiasi, maka semakin sedikit pertambahan berat kalus (Tabel 2).

Pertambahan berat kalus mengindikasikan adanya proliferasi sel-sel kalus setelah iradiasi sinar Gamma. Sel-sel kalus pada dosis 10 sampai 50 Gray, masih berproliferasi meskipun tidak sebanyak kalus kontrol. Pada perlakuan dosis tinggi (60-100 Gray), iradiasi tampak menghambat pertumbuhan atau proliferasi sel-sel kalus meskipun tidak sampai mengakibatkan kematian sel.

Tabel 1. Morfologi kalus 4 minggu setelah iradiasi sinar Gamma

Dosis Radiasi (Gray)	Morfologi Kalus	
	Struktur	Warna
0	Remah	Putih kekuningan
10	Remah	Putih kekuningan
20	Remah	Putih kekuningan, sebagian kehijauan
30	Remah	Putih kekuningan
40	Remah	Putih kekuningan
50	Remah	Putih kekuningan, sebagian kehijauan
60	Remah	Putih kekuningan
70	Remah	Kecoklatan
80	Remah	Putih kekuningan
90	Remah	Putih kekuningan, sebagian kehijauan
100	Remah	Putih kekuningan



Gambar 1. Pertumbuhan dan morfologi kalus 4 minggu setelah iradiasi sinar Gamma: (A) Kalus awal setelah diradiasi (0 minggu), (B) Kalus umur 4 minggu setelah diradiasi, berwarna putih kekuningan, (C) Kalus umur 4 minggu setelah diradiasi, berwarna putih kehijauan, (D) Kalus umur 4 minggu setelah diradiasi, berwarna kecoklatan (70 Gray)

Perubahan warna kalus dan perbedaan berat kalus setelah iradiasi kemungkinan terkait dengan terjadinya proses ionisasi yang mengakibatkan rusaknya ikatan atom pada molekul sehingga molekul melepaskan elektron, berubah muatannya dan menjadi ion. Ion atau radikal bebas ini akan merusak jaringan secara fisik kemudian mengubah atau mempengaruhi reaksi kimia pada sel. Proses ionisasi dari iradiasi sinar gamma dapat menyebabkan basa nukleotida salah berpasangan (transisi atau transversasi), aberasi kromosom atau mutasi di luar inti (Gustafsson and Ekberg, 1979).

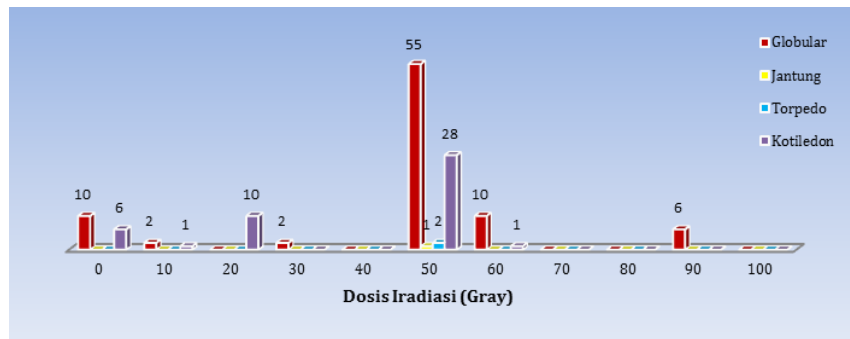
Tabel 2. Pertambahan berat kalus 4 minggu setelah iradiasi sinar Gamma

Dosis Radiasi (Gray)	Pertambahan Berat Kalus (Gram)
0	1.59 ^a
10	1.27 ^{bc}
20	1.42 ^{ab}
30	1.07 ^c
40	0.98 ^c
50	1.05 ^c
60	0.50 ^d
70	0.44 ^d
80	0.51 ^d
90	0.49 ^d
100	0.30 ^d

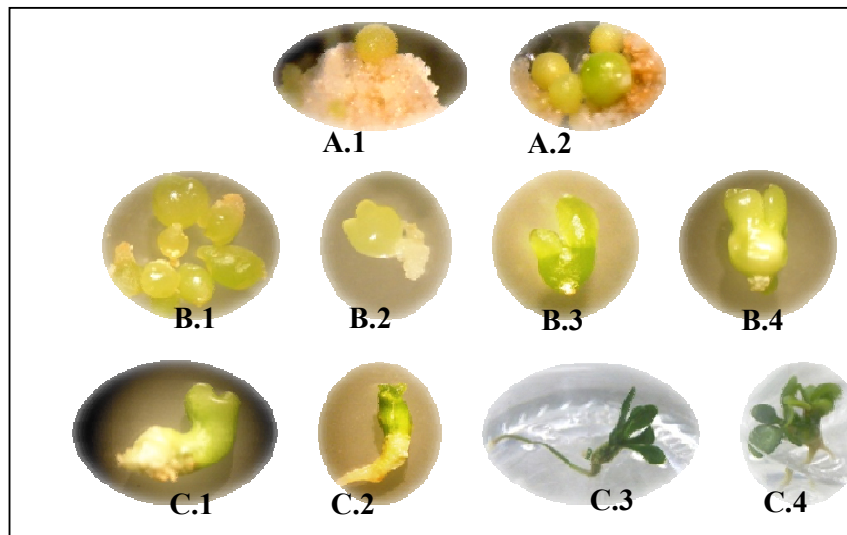
Keterangan : Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji DMRT pada taraf 5%.

Hasil yang diharapkan dari perlakuan induksi mutasi adalah diperolehnya mutan yang solid atau stabil dan dapat diwariskan ke generasi berikutnya. Mutan solid dapat diperoleh secara langsung, jika bagian yang diradiasi berupa kalus, suspensi sel, embrio somatik atau protoplas. Apabila kalus embriogenik diradiasi kemungkinan besar dapat menghasilkan mutan solid karena kultur kalus atau embriogenesis somatik berasal dari satu sel (Maluszynski *et al.*, 1995). Kelemahannya ialah bagian tersebut memiliki daya regenerasi yang rendah (van Harten 1998). Sehingga pada penelitian ini juga diamati kemampuan kalus dalam membentuk embrio somatik. Pada tahap ini, pengamatan dilakukan 4 minggu setelah kalus berada pada media MW + 0.5 mg/l ABA. Nampak jelas bahwa kalus perlakuan dosis 50 Gray mampu menghasilkan jumlah embrio

somatik tertinggi bila dibandingkan kontrol dan dosis iradiasi yang lain (Gambar 2). Kalus kontrol hanya mampu menghasilkan total jumlah embrio somatik sebanyak 16 embrio, sedangkan kalus perlakuan dosis 50 Gray mampu menghasilkan 5 kali lipat lebih banyak, yaitu 86 embrio. Kemampuan ini sudah dapat dilihat saat kalus pada tahap proliferasi setelah iradiasi. Warna kalus dosis 50 Gray yang kehijauan dapat mengindikasikan kemampuan ini. Kalus yang berwarna kehijauan pada dosis 20 dan 90 Gray, juga mampu membentuk embrio somatik walaupun tidak sebanyak kalus perlakuan dosis 50 Gray. Kalus dengan perlakuan dosis yang lainnya (10, 40, 60, 70, 80 dan 100 Gray) selama 4 minggu di media MW + 0.5 mg/l ABA masih belum dapat membentuk embrio somatik. Gambar 3 memperlihatkan tahapan pembentukan hingga perkecambahan embriosomatik.



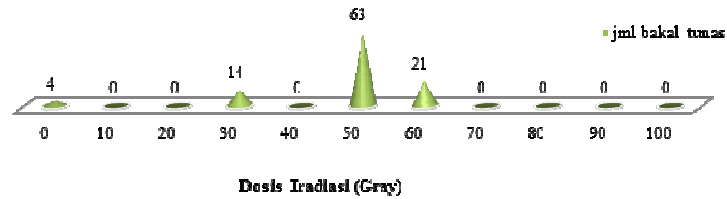
Gambar 2. Grafik pengaruh dosis iradiasi sinar Gamma terhadap pembentukan embrio somatik



Gambar 3. Pembentukan, pendewasaan dan perkecambahan embrio somatik
A. 1- 2Pembentukan embrio globular pada kalus dosis 50 Gray.
B. 1-4Perkembangan embrio somatik dari tahap globular sampai kotiledon.
C. 1- 4 Perkecambahan embrio somatik.

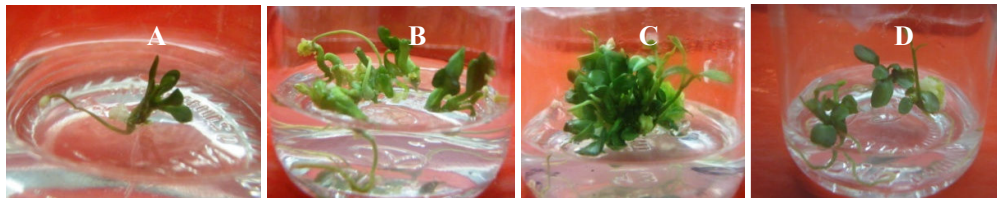
Tahap berikutnya adalah tahap perkecambahan embrio somatik membentuk bakal tunas. Pengamatan 4 minggu setelah embrio tumbuh pada media MW + 0,5 mg/l GA₃ menunjukkan jumlah embrio hasil iradiasi pada dosis 50 Gray berkecambah lebih banyak dibandingkan perlakuan yang lainnya. Perkecambahan embrio hasil iradiasi dosis 50 Gray pada media tersebut menghasilkan 63 bakal tunas, sedangkan pada kontrol hanya dihasilkan 4 bakal tunas dalam waktu 4 minggu di media perkecambahan (Gambar 4).

Perlakuan iradiasi pada dosis 30 dan 60 Gray masing-masing mampu menghasilkan 14 dan 21 bakal tunas. Padahal pada 4 minggu pertama setelah iradiasi (tahap proliferasi), kalus yang diradiasi pada kedua dosis tersebut tidak menunjukkan perubahan warna menjadi kehijauan, namun pada tahap selanjutnya, ternyata kalus dari kedua dosis tersebut mampu menghasilkan embrio dan dapat berkecambah menjadi bakal tunas. Sebaliknya, kalus pada dosis 20 dan 90 Gray, pada 4 minggu pertama setelah iradiasi (tahap proliferasi) menunjukkan perubahan warna kalus menjadi kehijauan. Kalus pada kedua dosis tersebut mampu membentuk embrio, namun untuk tahap perkecambahan nampaknya memerlukan waktu lebih dari 4 minggu.



Gambar 4. Grafik jumlah bakal tunas yang terbentuk dari kalus hasil iradiasi sinar Gamma

Tunas hasil regenerasi kalus kontrol menunjukkan pertumbuhan yang normal, sedangkan tunas hasil regenerasi kalus yang diradiasi pada dosis 30, 50 dan 60 Gray menunjukkan keragaman secara morfologi (Gambar 5). Tunas dari dosis 30, 50 dan 60 tidak tunggal, namun cenderung memiliki banyak cabang dan pendek (roset).



Gambar 5. Tunas hasil iradiasi sinar Gamma: A. 0 Gray; B. 30 Gray; C. 50 Gray; D. 60 Gray

Fenomena yang diperoleh tersebut dapat menggambarkan betapa beragamnya respon pertumbuhan kalus dan kemampuan kalus beregenerasi menjadi embrio dan kemampuan embrio untuk berkecambah menjadi tunas. Sistem regenerasi jeruk Siam melalui embriogenesis somatik telah berhasil dilakukan oleh Husni *et al.* (2010), sehingga media dan jenis serta konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan telah diketahui. Perlakuan induksi mutasi secara fisik dengan iradiasi sinar Gamma terhadap kalus telah mengakibatkan terjadinya perubahan pada sel dan mempengaruhi pertumbuhan dan kemampuan sel-sel kalus untuk beregenerasi menjadi bakal tunas secara embriogenesis somatik.

KESIMPULAN

Perlakuan iradiasi sinar Gamma terhadap kalus jeruk Siam mengakibatkan respon pertumbuhan kalus yang beragam. Kemampuan kalus membentuk embrio dalam jumlah terbanyak diperoleh pada perlakuan dosis 50 Gray, demikian pula jumlah bakal tunas terbanyak yang dihasilkan dari perkecambahan embrio diperoleh pada perlakuan dosis 50 Gray. Penelitian lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman yang terjadi terutama pada tingkat kromosom dan DNA dengan menggunakan marka genetik.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2010. Produksi Buah-buahan di Indonesia. <http://www.bps.go.id> [2 Juli 2010]
- Gustafson A., Ekberg. 1979. Type of mutation. *In: Manual on Mutation Breeding*. Technical Report Series. No. 119, IAEA. Vienna.
- Husni, A., M. Kosmiatin, I. Mariska, C. Martasari. 2008. Studi isolasi protoplas pada jeruk siam, p. 197-208. *Dalam: M. Winarno, Sabari, S. Subandiyah, L. Setyobudi, A. Supriyanto (Eds.). Seminar Nasional Jeruk. Prosiding Seminar Jeruk; Yogyakarta, 13-14 Juni 2007. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. 2008.*
- Husni, A., A. Purwito, I. Mariska, Sudarsono. 2010. Regenerasi jeruk Siam melalui embriogenesis somatik. *Jurnal AgroBiogen*. 6(2) : 75-83.

- Kawata M, K. Oono. 1998. Protoclonal variation in crop improvement, p. 135-148. *In: Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., (Eds.). Somaclonal Variation and Induce Mutations in Crop Improvement.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Maluszynski, M., B. S. Ahloowalia, B. Sigurbjörnsson. 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64 :185-210.
- Spiegel-Roy, P., E. E. Goldschmidt. 1996. *Biology of Citrus.* New York: Cambridge University Press.
- van Harten, A. M. 1998. *Mutation Breeding, Theory and Practical Applications.* Cambridge USA: Cambridge University Press.
- Veilleuex, R.E., M. E. Compton, J. A. Saunders. 2005. Use of protoplast for plant improvement, p. 213-224. *In: R. N. Trigiano, D. J. Gray (Eds).* *Plant Development and Biotechnology.* Florida USA: CRC Press LLC. hlm 213-224.