

## PENGARUH INDUKSI MUTASI SINAR GAMMA PADA REGENERASI KALUS EMBRIOGENIK KEPROK GARUT (*Citrus reticulata* L.)

Karyanti<sup>1,\*</sup>, Agus Purwito<sup>2</sup> dan Ali Husni<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT

<sup>2</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB.

<sup>3</sup> BB-Biogen, Kementan.

\* Corresponding author: kusdarsono@yahoo.com

### Abstract

Citrus is one of the prominent fruit commodities in Indonesia. The plant grows and widely spread and in some areas it becomes a major local fruit. Keprok Garut is one of local commodity which has some several superior such as easy to peel, fresh and sweet flavour, yellowish green skin and contain 12-15 seeds per fruit. To improve fruit quality like more attractive skin, seedless and sweeter and fresh taste as preferred by the consumers, it requires the appropriate method. Through mutation breeding method using Gamma rays it is expected Keprok Garut could meet consumers preference. The purpose of this study is to determine proliferation dose 50 (PD50) and Gamma-ray irradiation effect on the regeneration ability of embryogenic callus of Keprok Garut. Embryogenic callus irradiated with gamma rays at dose level of 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 Gray. Callus regenerated through embryogenesis and observation was made on development stages and growth level. After 6 weeks, the observation result in sub culture 1 shown that proliferation dose 50 (PD50) was obtained at dose of 58.93 Gray. Increased dose of irradiation could change the color of callus from yellowish white to brown and reduced callus weight at a dose of 10 Gray (1.83 g) and 100 Gray dose (0.65 gram). On observations of sub culture 2, it was found that callus weight increase varied. Highest callus weight at a dose of 20 Gray (3.04 g), 80 Gray (2.20 g), 10 Gray (1.94 g) and 100 Gray (1.75 g). At doses of 20, 80 and 100 Gray, 100% replication was able to form globular embryos at the highest number. At week 9 the highest number of cotyledons was obtained at dose of 20 Gray (22), 80 Gray (18) and 100 Gray (23).

*Key word* : dose, gray, proliferation dose, embryogenesis, embryo.

### PENDAHULUAN

Jeruk Keprok Garut adalah salah satu jenis jeruk yang banyak di tanam di Indonesia. Berdasarkan SK Menteri Pertanian No. 760 tahun 1999 menetapkan jenis jeruk tersebut sebagai varietas unggul. Deskripsi keprok Garut mempunyai rasa asam manis, kulitnya mudah dikupas, warna kulit hijau kekuningan dan mempunyai biji sekitar 12-15 biji/buah (Balitbangtan, 1999). Berdasarkan agroklimatnya varietas tersebut menghasilkan buah terbaik jika ditanam di dataran tinggi sekitar 700-1200 meter di atas permukaan laut. Hal ini merupakan salah satu pembatas produksi kedua varietas jeruk tersebut sehingga ketersediaannya tidak selalu ada setiap tahun (AAK, 1996).

Menurut Spiegel-Roy dan Goldschmidt (1996), kriteria buah jeruk yang digemari oleh konsumen dan pasar global adalah buah jeruk yang mempunyai biji sedikit atau tanpa biji (*seedless*), mudah dikupas dan memiliki warna yang menarik. Beberapa kriteria tersebut belum dimiliki oleh Keprok Garut sehingga kalah bersaing di pasar global. Untuk meningkatkan kualitas mutu buah jeruk Keprok Garut yang telah memiliki karakter buah unggul dapat memanfaatkan teknik pemuliaan mutasi. Aplikasi pemuliaan mutasi dapat dilakukan secara *in vitro*.

Beberapa mutagen yang mampu menginduksi keragaman diantaranya adalah mutagen fisik dan kimia. Untuk mutagen fisik dapat menggunakan sinar Gamma (Van Harten, 1998). Tingkat keberhasilan radiasi dalam meningkatkan keragaman populasi sangat ditentukan oleh radiosensitivitas. Radiosensitivitas dapat diukur berdasarkan nilai PD50 (*Proliferasi dose* 50), yaitu tingkat dosis yang menyebabkan proliferasi 50% dari populasi tanaman yang diradiasi. Dosis optimal biasanya terjadi di sekitar PD50. Selain itu kalus embriogenik hasil induksi mutasi harus mampu diregenerasi menjadi tanaman lengkap untuk seleksi selanjutnya. Penelitian ini bertujuan mengetahui PD50 (*Proliferasi Dose*) dan pengaruh iradiasi sinar Gamma terhadap regenerasi kalus embriogenik keprok Garut pada media Merigo (2011).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari Bulan Oktober 2011-Maret 2012. Induksi kalus dan proliferasinya dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB. Sedangkan untuk perlakuan iradiasi sinar gamma dilakukan di PATIR-BATAN. Bahan yang digunakan adalah kalus embriogenik asal nuselus jeruk keprok Garut. Media dasar yang digunakan adalah MS (Murashige and Skoog), vitamin MW (Morel and Wetmore), BAP, ABA, GA<sub>3</sub>, *Casein Hydrolysat*, gula, agar pematik, dan alkohol 70%. Alat yang digunakan di antaranya peralatan iradiasi *Gamma Chamber 4000A*, piala gelas, timbangan analitik, pipet, labu ukur, kompor atau *hot plate*, botol kultur, pinset, scalpel, gunting, *laminar air flow*, mikroskop.

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan satu faktor yaitu dosis iradiasi sinar Gamma (0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 Gray). Setiap perlakuan diulang lima kali dengan setiap ulangan yaitu satu botol kultur yang berisi lima clam kalus dengan berat kalus awal  $\pm 0.5$  gram. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam dengan uji F dan apabila hasilnya berbeda nyata akan dilakukan uji lanjut DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5% (Mattjik and Sumertajaya, 2006).

Kalus embriogenik Keprok Garut diletakkan dalam media MS tanpa zat pengatur tumbuh dan selanjutnya digunakan sebagai sumber kalus. Kalus embriogenik di iradiasi dengan sinar Gamma pada dosis 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 Gray. Kalus yang telah di iradiasi selanjutnya di sub kultur ke media MS+BAP 3 ppm (SK-1) (Merigo 2011) dan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25°C dengan intensitas cahaya 1 000-1 500 lux selama 6 minggu.

Setelah dilakukan pengamatan selanjutnya kalus di sub kultur ke media MS+ABA 2.5 ppm (SK-2) (Merigo 2011) dan di inkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25°C dengan intensitas cahaya 1000-1500 lux selama 9 minggu. Perubahan yang diamati warna dan struktur kalus, PD50, berat kalus, % kemampuan kalus membentuk globular, jumlah globular dan jumlah kotiledon yang terbentuk. Analisis PD50 berdasarkan data pengamatan kemampuan proliferasi yang selanjutnya di analisis dengan software berbasis *curve-fit analysis* (Finney 2005). Kotiledon yang terbentuk di sub kultur ke media perkecambahan MS + GA<sub>3</sub> 2,5 ppm (Merigo, 2011).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Warna dan Struktur Kalus

Kalus jeruk embriogenik berwarna putih kekuningan dengan struktur remah. Kalus embriogenik ini berpotensi untuk beregenerasi pada media yang tepat. Perubahan warna kalus merupakan salah satu indikasi adanya respon yang disebabkan induksi sinar Gamma. Terlihat pada Tabel 1 terjadi adanya perubahan warna seiring dengan lamanya waktu inkubasi.

Pada sub kultur 1 di minggu ke dua warna kalus masih terlihat seragam berwarna putih kekuningan, dan terlihat perubahan pada minggu ke empat khususnya pada dosis di atas 50 Gray. Pada dosis 80, 90, 100 Gray di minggu ke enam warna kalus berubah menjadi coklat.

Perubahan warna kalus dari putih kekuningan menjadi putih kecoklatan dan menjadi coklat seperti pada Gambar 1 di duga akibat adanya peningkatan dosis radiasi sehingga menghambat atau menurunkannya kandungan auksin endogen dalam sel. Auksin pada tanaman berperan dalam pembesaran sel, menghambat terbentuknya klorofil, dan induksi kalus (Watimena, 1998).



Gambar 1. Perubahan warna kalus, A. putih kekuningan, B. putih kecoklatan, C. coklat

Begitu pula pada struktur kalus yang diamati secara visual dan dirasakan strukturnya dengan memegang kalus pada ujung pinset steril. Hasil dari pengamatan struktur kalus seperti pada Tabel 1

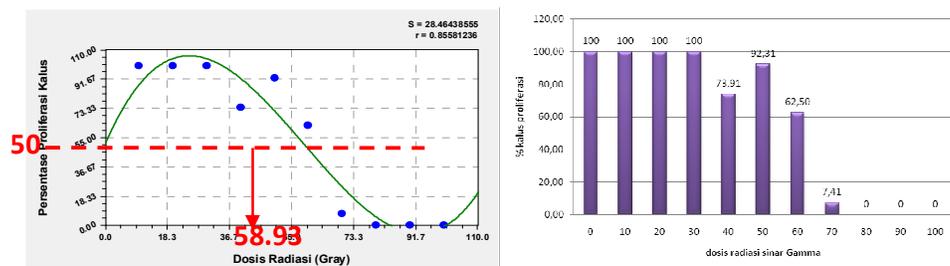
diperoleh hasil bahwa dengan peningkatan dosis iradiasi menyebabkan kalus menjadi remah dan terasa kering sehingga sulit diangkat dengan piset. Perubahan struktur kalus yang terbentuk diduga pengaruh dari dosis iradiasi yang menyebabkan terjadinya kematian sel atau berkurangnya kemampuan sel dalam menyerap mineral yang tersedia dalam media tanam.

Tabel 1. Perubahan warna kalus pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam

Dosis Radiasi (Gray)	Warna Kalus			Stuktur Kalus 6 MST
	2 MST	4 MST	6 MST	
0	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah
10	Putih kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah lengket
20	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah lengket
30	Putih kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah lengket
40	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah lengket
50	Putih kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Remah lengket
60	Putih Kekuningan	Putih Kecoklatan	Putih Kecoklatan	Remah lengket
70	Putih kekuningan	Putih Kecoklatan	Putih Kecoklatan	Remah kering
80	Putih Kekuningan	Putih Kecoklatan	Coklat	Remah kering
90	Putih kekuningan	Putih Kecoklatan	Coklat	Remah kering
100	Putih Kekuningan	Putih Kecoklatan	Coklat	Remah kering

### Proliferasi Dose 50 (PD<sub>50</sub>)

Proliferasi kalus diukur berdasarkan peningkatan diameter kalus. Pengamatan dilakukan tiap minggu sampai minggu ke empat pada sub kultur 1. Diameter kalus tidak bertambah pada minggu ke lima dan ke enam setelah tanam. Pada Gambar 2 terlihat % proliferasi maksimal terjadi pada dosis rendah yaitu sekitar 0-30 Gray yang mencapai 100% dan terjadi penurunan yang bervariasi pada dosis 40 Gray (73.91%), 50 Gray (92.31 %) sampai 70 Gray (7.41 %), dan tidak terjadi peningkatan diameter kalus pada dosis tinggi sekitar 80-100 Gray (0%). Kondisi ini menunjukkan terjadi penghambatan pembelahan sel dengan meningkatnya dosis iradiasi. Terhambatnya pembelahan sel atau matinya sel menurut Soeranto (2003) dapat diakibatkan oleh dua hal yaitu kematian yang diakibatkan karena sel langsung terpapar sinar radiasi dan kematian secara tidak langsung akibat adanya pengaruh toksik dari radikal bebas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan OH<sup>-</sup> hasil reaksi ionisasi.



Gambar 2. Diagram kurva hasil analisis PD<sub>50</sub> dan % proliferasi pada kalus Keprok Garut

Radiosensitivitas pada kalus embriogenik dapat diperoleh dengan pendekatan PD<sub>50</sub> (*Proliferation Dose 50%*), yaitu dosis radiasi yang menyebabkan proliferasi kalus embriogenik 50% dibandingkan kontrol (Witjaksono and Litz, 2004).

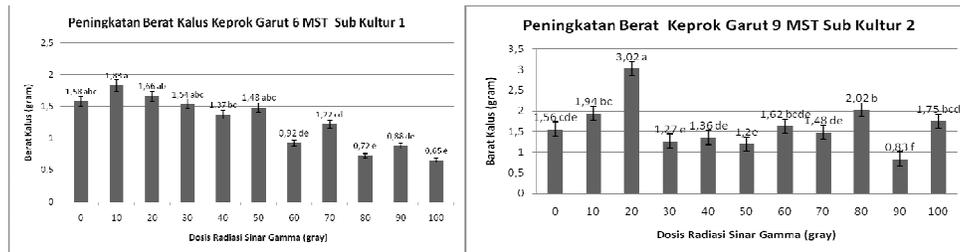
Dari hasil analisis seperti pada Gambar 2 diperoleh PD<sub>50</sub> berada disekitar 58.93 Gray. Hasil ini menunjukkan dosis optimal pada kalus keprok Garut yang diradiasi berada di sekitar 58.93 Gray. Untuk selanjutnya dosis yang berada disekitar dosis optimal diduga dapat menghasilkan keragaman tertinggi.

### Berat Kalus

Pada sub kultur 1 berat kalus menurun seiring dengan meningkatnya dosis iradiasi sinar Gamma seperti terlihat pada Gambar 3. Dari hasil analisis anova terjadi pengaruh sangat nyata pada perlakuan dosis iradiasi sinar Gamma. Dan dari hasil uji lanjut diperoleh dosis 10 Gray dan 100 Gray berbeda nyata terhadap semua perlakuan. Dari hasil rata-rata peningkatan berat kalus tertinggi dihasilkan pada dosis 10 Gray (1.83 gram) dan yang terendah pada dosis 100 Gray (0.65 gram).

Pada sub kultur 2 peningkatan berat kalus bervariasi seperti terlihat pada Gambar 3. Hasil analisis anova dan uji lanjut terlihat dosis 20 Gray berbeda nyata dengan dosis 80 Gray begitu pula dengan dosis

perlakuan yang lain (Gambar 3). Peningkatan berat kalus yang maksimal diperoleh pada dosis 20 Gray dan 80 Gray sedangkan berat kalus terendah yaitu pada dosis 90 Gray.



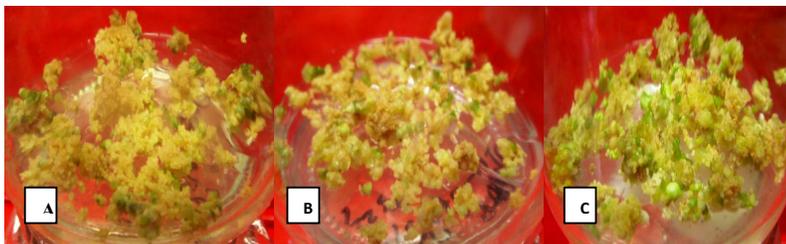
Gambar 3. Peningkatan berat kalus minggu ke 6 setelah tanam pada sub kultur 1 dan 2

Kalus yang mengalami kerusakan sel dapat menyebabkan terhambatnya proliferasi sehingga menurunkan berat kalus dan berefek menurunnya kemampuan beregenerasi. Kerusakan sel yang tinggi dapat terjadi pada materi yang banyak mengandung air. Kondisi ini disebabkan karena materi yang terjebak dalam kondisi ionisasi akibat iradiasi sinar gamma akan mengalami penguraian menjadi  $H_2O+e^-$ . Dimana pada reaksi selanjutnya akan menghasilkan radikal bebas yang akan bergabung dengan peroksida. Jika peroksida dan senyawa-senyawa lainnya bereaksi dengan molekul-molekul lain akan membentuk suatu senyawa yang mampu mempengaruhi sistem biologi tanaman (Van Harten, 1998).

### Jumlah Globular

Tahapan pembentukan embrio (globular, jantung, torpedo, kotiledon) agak sulit untuk diamati secara detail. Pengamatan dilakukan secara visual, dan tahap yang paling mudah teramati dari luar botol kultur adalah tahap globular matang yang telah berwarna hijau dan tahap kotiledon.

Terbentuknya globular yang mulai menghitam pada sub kultur 1 ini masih belum maksimal. Jumlah globular bisa teramati pada tahap pendewasaan yaitu pada sub kultur 2 seperti pada Gambar 4. Tahap pendewasaan embrio somatik pada jeruk menurut Husni (2010) dimulai dari terbentuknya globular, jantung, torpedo dan kotiledon. Tahapan pendewasaan ini dibantu induksinya dengan adanya zat pengatur tumbuh ABA yang ditambahkan dalam media pada sub kultur 2. Menurut Egerstsdotter (1999), embrio dirangsang untuk menjadi dewasa dengan menggunakan asam absisik (ABA) dan adanya peningkatan potensial osmotik. Menurut Renukdas *at al.*(2006) peningkatan efisiensi pendewasaan embrio somatik dapat dilakukan dengan penambahan etilen antagonis pada konsentrasi tinggi (10  $\mu$ M) seperti spermidine, ABA dan  $AgNO_3$ .

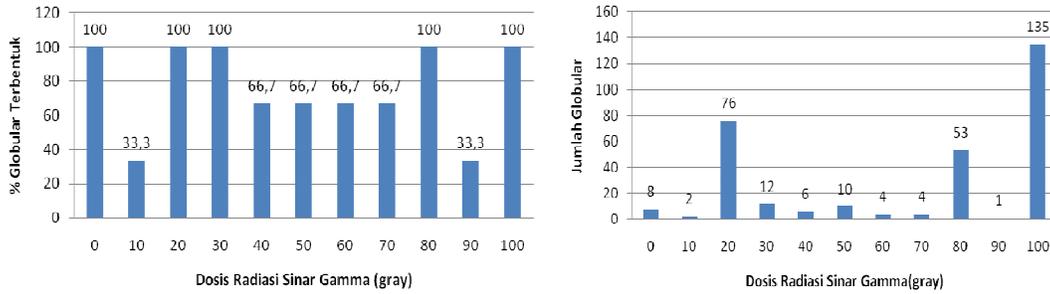


Gambar 4. Jumlah globular yang terbentuk pada perlakuan dosis: A.20 Gray, B. 80 Gray dan C. 100 Gray.

Dari hasil analisis sidik ragam dan uji lanjut pada sub kultur ke 2 diperoleh jumlah globular yang berbeda nyata antara dosis 20 Gray dan 80 Gray dengan dosis 100 Gray, sedangkan untuk perlakuan yang lain terlihat tidak berbeda nyata.

Pada setiap dosis perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan dari setiap ulangan memberikan respon induksi globular yang berbeda. % globular tertinggi yaitu 100% yang terbentuk dari 5 ulangan pada setiap perlakuan diperoleh pada dosis 0, 20, 30, 80 dan 100 Gray seperti pada Gambar 5.

Dan jumlah globular dari total seluruh ulangan dihasilkan jumlah globular terbanyak yaitu pada dosis 20 Gray (76 globular), 80 Gray (53 globular) dan 100 Gray (135 globular) (Gambar 5). Dari data tersebut terlihat peningkatan dosis iradiasi pada kalus keprok Garut mampu meningkatkan induksi terbentuknya globular.

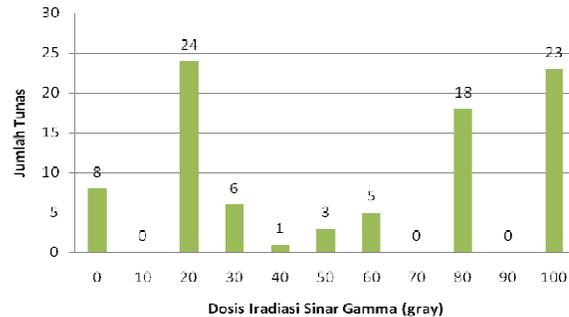


Gambar 5. Persentase globular (a) dan jumlah globular yang terbentuk (b)

Meningkatnya jumlah globular diduga selain dipengaruhi dosis iradiasi sinar Gamma, menurut George *et al.* (2008) juga dipengaruhi oleh faktor lain di antaranya jumlah auksin, sitokinin, ABA, karbohidrat baik endogen maupun eksogen. Iradiasi sinar Gamma pada dosis tertentu telah mampu mengubah kemampuan sel menjadi lebih aktif dalam berubah menjadi globular dan memasuki tahap pendewasaan.

### Jumlah Tunas

Globular yang terbentuk dalam tahap pendewasaan dibiarkan sampai memasuki tahap kotiledon. Setiap globular yang berhasil menjadi kotiledon selanjutnya di panen. Setiap ulangan pada setiap perlakuan menghasilkan jumlah kotiledon berbeda bahkan ada pula perlakuan yang belum menghasilkan kotiledon sampai batas inkubasi 75 hari setelah tanam. Kondisi ini menunjukkan bahwa dibutuhkan waktu yang berbeda untuk setiap globular yang telah terbentuk untuk memasuki tahapan sampai terbentuk kotiledon.



Gambar 6. Jumlah globular yang berubah menjadi kotiledon

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada setiap perlakuan dihasilkan data jumlah kotiledon yang bervariasi. Kotiledon terbentuk 100% pada dosis perlakuan 0, 20, 80 dan 100 Gray. Dari data hasil pengamatan terlihat pada Gambar 6 jumlah globular yang berkembang menjadi kotiledon terbanyak pada dosis perlakuan 20 Gray (24 kotiledon), 80 Gray (18 kotiledon) dan 100 Gray (23 kotiledon). Hasil ini menunjukkan respon yang positif pada perlakuan dosis sinar Gamma 20, 80 dan 100 Gray dalam menginduksi globular sampai membentuk kotiledon. Kotiledon yang terbentuk selanjutnya di sub kultur ke media perkecambahan dan di elongasi agar membentuk tunas. Pada tahap perkecambahan ini kotiledon diinduksi dalam media yang mengandung GA<sub>3</sub>. Menurut Davies (2004) salah satu zat pengatur tumbuh yang berperan dalam proses perkecambahan embrio somatik adalah GA<sub>3</sub>. GA<sub>3</sub> berperan dalam menggiatkan fungsi kerja aktivitas  $\alpha$ -amilase dalam metabolisme sehingga terjadi perkecambahan (Woodger *et al.*, 2004). Perkecambahan embrio yang sempurna ditandai dengan pembentukan akar dan munculnya tunas (Gmietter and Moore 1986).

## KESIMPULAN

1. Kalus embriogenik jeruk Keprok Garut hasil induksi mutasi sinar Gamma dapat berproliferasi mulai dari dosis 0(kontrol),10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 Gray.
2. Diperoleh dosis optimal berdasarkan *Proliferation Dose* (PD50) pada dosis 58.93 Gray.

3. Peningkatan dosis iradiasi berpengaruh pada perubahan warna dan struktur kalus.
4. Peningkatan dosis iradiasi sinar Gamma berpengaruh pada meningkatnya jumlah globular dan jumlah kotiledon yang terbentuk.
5. Dosis iradiasi sinar Gamma yang mampu menginduksi globular dan membentuk kotiledon dalam jumlah terbanyak yaitu dosis perlakuan 20 Gray, 80 Gray dan 100 Gray .

## DAFTAR PUSTAKA

- [Balitbangtan] Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Pertanian. 1999. Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 760/kpts/TP.240/6/99 tentang Pelepasan Jeruk Keprok Garut sebagai varietas unggul. Jakarta: Balitbangtan Deptan
- Davies, J.P. 2004. Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction and Action. The Netherlands: Kuwer Academic Publisher.
- Egertsdotter, U. 1999. Somatic embriogenesis in picea suspensions culture, p. 51-60. *In*: Hall DR (ed.). Plant Cell Culture Protocols. New Jersey: Humana Press.
- George, E.F., M. A. Hall, G. J. de Klerk. 2008. Plant Propagation By Tissue Culture Volume ke-1, *The Background*. Edisi ke-3. Netherland: Springer. hml 335-354.
- Gmitter, F, G. A. Moree. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus* : embryo production, germination and plant survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6:139 – 147.
- Husni, A. 2010. Fusi protoplas interspesies antara jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour.) dengan Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.) [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Mattjik, A. A., I. M. Sumertajaya. 2006. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. Bogor: IPB Press. hlm100 – 109.
- Merigo, A. J. 2011. Studi regenerasi tanaman jeruk keprok Batu 55 (*Citrus Reticulata*) melalui jalur embrio somatik [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Redukdas, NN, M. L. Mohan, S. S. Khuspe, S. K. Rawal. 2006. Influence of phytohormones, culture conditions and ethylene antagonist on somatic embryo maturation and plant regeneration in papaya. *International Journal of Agricultural Reseach* 1(2):151 – 160.
- Soeranto, H. 2003. Peran Iptek Nuklir dalam Pemuliaan Tanaman untuk Mendukung Industri Pertanian. Jakarta: Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi. Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN).
- Spiegel-Roy P, E. E. Goldschmidt. 1996. *Biology of Citrus*. New York: Cambridge University Press.
- van Harten, AM. 1998. *Mutation Breeding, Theory and Practical Applications*. Cambridge USA: Cambridge University Press.
- Wattimena G.A. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU, IPB.
- Witjaksono, R. E. Litz. 2004. Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 139–147.
- Woodger F, J. V. Jacobsen, F. Gubler. 2004. Gibberllin action in germinated cereal grains. *In*: Davies PJ (ed.). *Plant Hormones*. The Netherlands: Kluwer Academics Publisher.