

PENENTUAN DOSIS LETHAL IRRADIASI SINAR GAMMA PADA KALUS TEBU (*Saccharum officinarum*)

Sri Suhesti^{1,2}, Nurul Khumaida², Muhamad Syukur², Ali Husni³, dan G.A. Wattimena²

¹Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

²Institut Pertanian Bogor

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRACT

The successful of gamma irradiation rays is influenced by the sensitivity of plant genotype. This aim of this study was to determine lethal dosage 20 (LD₂₀) and 50 (LD₅₀) calli sugarcane after irradiated by gamma rays. The research was conducted on August-December 2011 in the laboratory of UPBUP, IAARD and PATIR BATAN. The experiments were arranged factorial in Randomized Completely Design 2 x 8, with 3 replications (4 experimental units respectively). The first factor was sugarcane genotypes, i.e. PSTK 91632 and PSJT 941. The second factor was dosage of gamma irradiation i.e. 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 gy. The observed variables were gained weight of calli and percentage of regenerated calli. The Data were analyzed using the Program SAS 9.1. The LD₂₀ and LD₅₀ were determined by Program Best Curve-Fit Analysis. The results showed that dosage of irradiation significantly affected the inhibition of the growth of sugarcane calli. The irradiation dosage more significantly affected to percentage of regenerated calli than gained weight of calli. The best model for lethal dosage of gained calli weight was $Y = 97.06 - 1.82x + 0.01x^2$, where LD₂₀ = 10.10 gy and LD₅₀ = 34.09 gy. The best model for lethal dosage of percentage of regenerated calli was $Y = 99.83 - 3.29x + 0.03x^2$, where LD₂₀ = 6.36 gy and LD₅₀ = 17.69 gy.

Key words: Sugarcane, *Saccharum officinarum*, lethal dosage, irradiation, gamma rays.

ABSTRAK

Keberhasilan perlakuan iradiasi sinar gamma sangat ditentukan oleh sensitivitas genotipe tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan Dosis Lethal 20 (LD₂₀) dan 50 (LD₅₀) pada kalus tebu yang diradiasi sinar gamma. Penelitian ini dilakukan mulai Agustus-Desember 2011 di Laboratorium UPBUP, Badan Litbang Pertanian dan PATIR BATAN. Percobaan disusun secara faktorial dalam lingkungan Rancangan Acak Lengkap 2 x 8, dengan 3 ulangan (masing-masing terdiri atas 4 unit percobaan). Faktor pertama adalah genotipe tebu, yaitu PSTK 91632 dan PSJT 941. Faktor kedua adalah dosis iradiasi sinar gamma yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 gy. Peubah yang diamati penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi. Data dianalisis menggunakan Program SAS 9.1. LD₂₀ dan LD₅₀ ditentukan menggunakan Program *Best Curve-fit Analysis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis iradiasi berpengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan kalus tebu. Penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi semakin menurun dengan kenaikan dosis radiasi sinar gamma. Dosis iradiasi lebih nyata pengaruhnya terhadap persentase kalus yang beregenerasi dibandingkan penambahan bobot kalus. Model dosis lethal terbaik untuk penambahan bobot kalus berbentuk kuadratik dengan persamaan $Y = 97.06 - 1.82x + 0.01x^2$, dengan LD₂₀ = 10,10 gy dan LD₅₀ = 34,09 gy sedangkan untuk persentase kalus yang beregenerasi mempunyai persamaan $Y = 99.83 - 3.29x + 0.03x^2$, dengan LD₂₀ = 6,36 gy dan LD₅₀ = 17,69 gy.

Kata kunci: Tebu, *Saccharum officinarum*, lethal dosis, iradiasi, sinar gamma.

PENDAHULUAN

Tebu merupakan tanaman yang membiak secara vegetatif sehingga variabilitas genetiknya lebih sempit dibanding tanaman membiak secara generatif. Untuk memperoleh genotipe baru dalam program pemuliaan tanaman tebu sangat tergantung pada rekombinasi dan segregasi progeni dari

individu heterosigot. Tanaman tebu merupakan allopoliploid dengan $n = 5, 6, 7, 8, 9$. Diduga kromosom dasar genus *Saccharum* adalah 10 (Alexander, 1973).

Upaya perbaikan genetik pada tanaman tebu secara konvensional sulit dilakukan karena tingginya tingkat poliploid tanaman tebu (Gilbert *et al.*, 2005). Dengan pertimbangan tersebut, maka lebih menjanjikan bila upaya perbaikan genetik dilakukan salah satunya melalui teknik induksi mutasi. Mutasi merupakan salah satu cara yang dipandang paling murah dan cepat dalam upaya perbaikan genetik tanaman. Menurut Witjaksono (2003), induksi mutasi dapat digunakan untuk merubah satu atau dua sifat tanaman.

Induksi mutasi bisa dilakukan menggunakan mutagen fisik maupun kimia (Chopra 2005). Di antara mutagen fisik yang ada, irradiasi sinar Gamma paling banyak digunakan dalam usaha pemuliaan tanaman karena dapat meningkatkan variabilitas genetik untuk menghasilkan mutan baru (Wattimena, 1992; Al-Safadi *et al.*, 2000).

Irradiasi sinar Gamma memiliki energi dan daya tembus yang tinggi. Mutagen fisik ini terkait frekuensi dan spektrum iradiasi dan tergantung pada dosis dan laju dosis yang digunakan. Pengaruh iradiasi fisik ini sangat efisien menyebabkan perubahan materi genetik. Mutagen fisik ini bersifat sebagai radiasi pengion (*ionizing radiation*) dan mampu menimbulkan ionisasi, melepas energi ionisasi ketika melewati atau menembus materi. Pada saat materi reproduksi tanaman terkena radiasi, proses ionisasi akan terjadi dalam jaringan dan menyebabkan perubahan pada tingkat sel, genom, kromosom dan DNA (Medina *et al.*, 2005).

Perubahan yang terjadi pada materi genetik ini biasanya diekspresikan pada fenotipe tanaman dan diturunkan ke generasi berikutnya. Namun adakalanya tidak diekspresikan secara fenotipik (*silent mutation*). Mutasi yang dikehendaki umumnya bersifat positif dan tergantung dengan tujuan pemuliaan, sedangkan mutasi yang bersifat negatif berupa kerusakan fisiologis, tanaman steril, tanaman abnormal maupun kematian.

Respon tanaman terhadap efek iradiasi sinar gamma, selain dipengaruhi oleh jenis kultur yang digunakan juga tergantung dari laju dosis iradiasi yang digunakan. Laju dosis iradiasi adalah jumlah dosis terserap per satuan waktu (rad/detik atau Gy/detik) (Ismachin, 1988). Dosis yang tinggi umumnya mengakibatkan kematian, sedangkan pada dosis rendah umumnya hanya menyebabkan perubahan abnormal pada fenotipe tanaman. Pengaruh dosis radiasi terhadap persen kematian, pertumbuhan, dan fertilitas telah banyak dilaporkan. Sedangkan pada dosis sedang sampai rendah, kemampuan adaptasi tanaman dapat dipertahankan, dan bersifat dapat balik.

Sensitivitas terhadap radiasi dapat diukur berdasarkan nilai LD (*lethal dose*) yaitu dosis yang menyebabkan kematian dari populasi tanaman yang diradiasi. Tingkat sensitivitas tanaman dipengaruhi oleh jenis tanaman, fase tumbuh, ukuran, dan bahan yang akan dimutasi, serta sangat bervariasi antar jenis tanaman dan antar genotipe (Banerji dan Datta, 1992). Dalam induksi mutasi, beberapa studi menunjukkan bahwa dosis optimum yang dapat menghasilkan mutan terbanyak umumnya diperoleh di sekitar LD (Datta 2001). Variabilitas mutan tertinggi terdapat pada mutan hasil iradiasi sinar gamma di sekitar LD₂₀ dan LD₅₀ (Soeranto, 2011). Untuk mendapatkan nilai LD₂₀ dan LD₅₀, digunakan program *best curve-fit analysis*, yaitu satu program analisis statistik yang dapat digunakan untuk mencari persamaan model terbaik.

Induksi mutasi menggunakan sinar gamma, telah banyak digunakan untuk menginduksi mutasi pada beberapa genera tanaman, diantaranya *Chrysanthemum morifolium* (Yamaguchi *et al.*, 2008), *Ipomea batatas* (Wang *et al.*, 2006), *Orthosiphon stamineus* (Pick Kiong *et al.*, 2008), *Saccharum* sp. (Patade dan Suprasanna 2008), *Sorghum bicolor* (Larik *et al.* 2009), padi (Bibi *et al.*, 2009), *Triticum aestivum* (Singh dan Balyan 2009), dan kacang-kacangan (Tah dan Saxena 2009). Teknik induksi mutasi sangat baik digunakan untuk tanaman yang mengalami masalah inkompatibilitas yang tinggi seperti tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan Dosis Lethal 20 (LD₂₀) dan 50 (LD₅₀) pada kalus tebu yang diradiasi sinar gamma.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan mulai Agustus sampai Desember 2011 di Laboratorium UPBUP, Badan Litbang Pertanian dan PATIR BATAN, Jakarta.

Bahan tanam yang digunakan adalah 2 genotipe tebu, yaitu PSTK 91632 dan PSJT 941. Media yang digunakan berupa media dasar MS yang ditambahkan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin serta bahan lain yang dapat meningkatkan pertumbuhan. Alat-alat yang digunakan antara lain *laminar air flow cabinet*, oven, autoklaf, mikroskop, alat gelas, alat diseksi dan lain-lain.

Penelitian menggunakan Rancangan acak lengkap faktorial 2 x 8, yang diulang sebanyak 3 kali dan setiap botol terdiri atas 4 unit percobaan. Faktor pertama genotipe tebu yaitu PSTK 91632 dan PSJT 941. Faktor kedua dosis irradiasi sinar gamma, yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 gy. Kombinasi perlakuan secara keseluruhan terdiri atas 16 kombinasi yang diulang 3 kali.

Induksi kalus embriogenik menggunakan daun muda yang masih menggulung. Eksplan dicuci dengan sabun dan disterilisasi baru kemudian ditanam. Sterilisasi eksplan dengan cara sterilisasi bakar. Eksplan yang telah disterilisasi kemudian dipotong-potong dengan ukuran $\pm 0,2$ cm dan di tanam pada media untuk induksi kalus.

Media untuk induksi kalus menggunakan media dasar Murashige-Skoog (MS) dengan penambahan 2,4-D 3 mg/l dikombinasikan dengan casein hidrolisat 3 g/l. Satu botol kultur ditanami sebanyak 4 eksplan. Kemudian botol diletakkan di dalam ruang kultur dalam kondisi gelap agar pembentukan kalus lebih optimal. Untuk menginduksi proliferasi kalus dilakukan sub kultur setiap 4 minggu pada media yang sama sebanyak 3 kali.

Kalus embriogenik yang telah berumur 3 bulan kemudian diradiasi sinar gamma dengan dosis irradiasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 gy. Kalus yang telah diradiasi dipulihkan pada media tanpa zat pengatur tumbuh MS 0 selama 2 minggu dan kemudian dipindahkan ke media regenerasi (MS + 2,4 D 0,3 ml/l + IBA 0,5 mg/l + Casein hidrolisat 3 g/l). Subkultur dilakukan dengan periode kultur 4 minggu. Inkubasi dilakukan selama 2-3 bulan di ruang kultur. Biakan diletakkan pada rak kultur menggunakan lampu TL dengan intensitas penyorotan sebesar ± 1.000 lux selama 16 jam dalam sehari. Pengamatan dilakukan terhadap peubah penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi serta visual kalus pada umur 2 bulan setelah irradiasi. Data dianalisa varian menggunakan program SAS 9.1 dan jika ada beda nyata dilanjutkan pakai DMRT. Penentuan LD₂₀ dan LD₅₀, menggunakan program *best curve-fit analysis*, untuk mencari persamaan model terbaik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan perlakuan iradiasi sangat ditentukan oleh sensitivitas genotipe yang diradiasi terhadap dosis radiasi yang diberikan. Analisis data hasil pengamatan kalus dua genotipe tebu PSJT 941 dan PSTK 91632 umur 2 bulan setelah diradiasi sinar gamma dosis 0-70 gy dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil analisis menunjukkan terdapat beda nyata antar perlakuan dosis iradiasi sinar gamma pada peubah penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi. Hal ini berarti perlakuan iradiasi mempengaruhi pertumbuhan kalus tebu, yaitu pada penambahan bobot kalus maupun persentase kalus beregenerasi. Semakin tinggi dosis iradiasi maka semakin tinggi penghambatan pertumbuhan kalus tebu.

Tingkat sensitivitas terhadap iradiasi sinar gamma pada kalus dua genotipe tebu yang digunakan, yaitu PSTK 91632 dan PSJT 941 sama. Hal ini dapat dilihat dari Tabel 1 yang menunjukkan tidak ada beda nyata antar genotipe tebu maupun interaksi antara genotipe dan dosis iradiasi. Ini kurang sesuai dengan pernyataan Banerji dan Datta 1992 yang menyatakan bahwa tingkat sensitivitas tanaman terhadap dosis iradiasi sinar gamma berbeda-beda antar genotipe tanaman. Kemungkinan hal ini terjadi karena jumlah genotipe yang diujikan terbatas jumlahnya.

Perlakuan dosis iradiasi sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus tebu, semakin tinggi dosis iradiasi maka semakin besar penghambatan pertumbuhan kalus tebu. Pada perlakuan kontrol/tanpa iradiasi, mempunyai pertumbuhan kalus tebu terbaik. Pada kalus umur 2 bulan setelah di iradiasi 70 gy, menunjukkan masih terdapat penambahan bobot kalus. Kemampuan kalus beregenerasi lebih mudah terhambat dibanding penambahan bobot kalus dimana pada dosis 40 gy persentase kalus beregenerasi sudah bernilai 0 walaupun pada perlakuan 50 gy masih terdapat kalus yang beregene-

Tabel 1. Analisis varian penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi ada kalus tebu umur 2 bulan setelah iradiasi sinar gamma.

Sumber varian	Kuadrat Tengah	
	Penambahan bobot kalus (g)	Persentase kalus yang beregenerasi
Genotipe	0,88 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Dosis iradiasi	2,70 **	0,22 **
Genotipe * Dosis Irradiasi	0,35 ^{ns}	0,13 ^{ns}
Rerata	1,47	0,15

Tabel 2. Pengaruh dosis iradiasi sinar gamma terhadap rerata penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi pada kalus tebu umur 2 bulan setelah iradiasi.

Dosis Irradiasi (gy)	Rerata	
	Penambahan bobot kalus (g)	Persentase kalus yang beregenerasi
0	2,63 a	0,48 a
10	2,15 ab	0,26 b
20	1,73 bc	0,38 ab
30	0,96 de	0,05 c
40	1,19 cde	0,00 c
50	1,47 bcd	0,03 c
60	0,99 cde	0,00 c
70	0,64 e	0,00 c

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada taraf 5%.

rasi tetapi jumlahnya sangat kecil. Penambahan dosis irradiasi diatas 50 gy menyebabkan tidak ada kalus yang beregenerasi (Tabel 2).

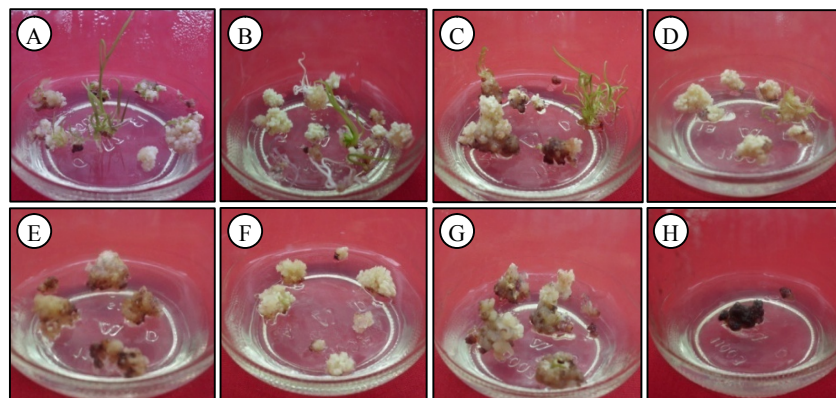
Tabel 3 menunjukkan bahwa tidak ada beda nyata antar genotipe tebu pada semua peubah yang diamati. Genotipe PSTK 91632 mempunyai penambahan bobot kalus lebih baik dibandingkan dengan genotipe PSJT 941, sedangkan pada persentase kalus yang beregenerasi terbaik pada genotipe PSJT 941.

Penampilan visual pada 2 genotipe kalus tebu umur 2 bulan setelah irradiasi pada beberapa dosis irradiasi dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

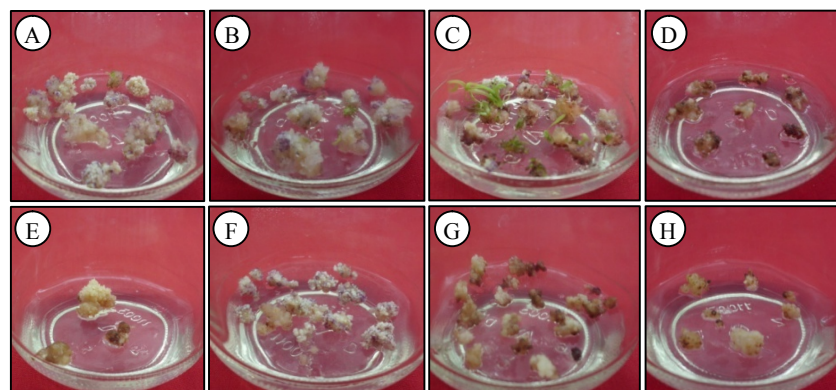
Tabel 3. Rerata penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi pada 2 kalus genotipe tebu umur 2 bulan setelah irradiasi sinar gamma.

Genotipe	Rerata	
	Penambahan bobot kalus (g)	Persentase kalus yang beregenerasi
PSJT 941	1,33 a	0,16 a
PSTK 91632	1,61 a	0,14 a

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada taraf 5%.



Gambar 1. Penampilan visual kalus tebu genotipe PSJT 941 umur 2 bulan setelah irradiasi pada beberapa dosis irradiasi sinar gamma, A = 0 gy, B = 10 gy, C = 20 gy, D = 30 gy, E = 40 gy, F = 50 gy, G = 60 gy, H = 70 gy.

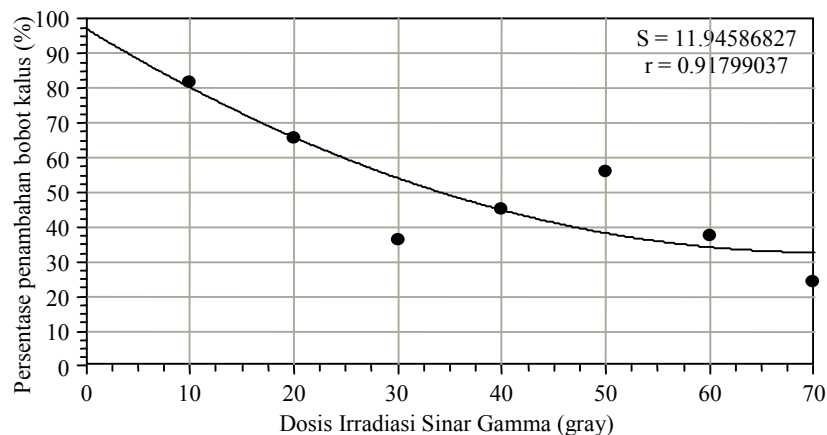


Gambar 2. Penampilan visual kalus tebu genotipe PSTK 91632 umur 2 bulan setelah irradiasi pada beberapa dosis irradiasi sinar gamma, A = 0 gy, B = 10 gy, C = 20 gy, D = 30 gy, E = 40 gy, F = 50 gy, G = 60 gy, H = 70 gy.

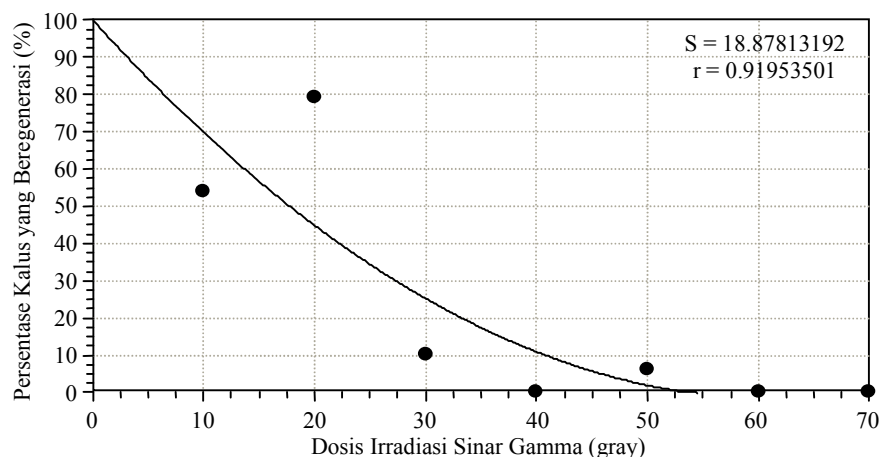
Hasil analisa program *best curve-fit analysis* untuk menentukan LD₂₀ dan LD₅₀, maka diperoleh persamaan model terbaik berdasarkan kedua peubah yang diamati. Penentuan dosis lethal irradiasi pada kalus tebu berdasarkan peubah penambahan bobot kalus sampai umur 2 bulan setelah irradiasi maka diperoleh persamaan model terbaik adalah kuadratik dengan persamaan $Y = 97,06 - 1,82x + 0,01x^2$, sehingga diperoleh dosis lethal LD₂₀ = 10,10 gy serta LD₅₀ = 34,09 gy (Gambar 3).

Penentuan dosis lethal berdasarkan peubah persentase kalus yang beregenerasi juga mempunyai persamaan model terbaik yaitu berbentuk kuadratik dimana persamaan modelnya yaitu $y = 99,83 - 3,29x + 0,03x^2$, sehingga diperoleh dosis lethal LD₂₀ = 6,36 gy dan LD₅₀ = 17,69 gy (Gambar 4).

Hasil pengukuran LD₅₀ untuk persentase kalus yang beregenerasi hampir sama dengan hasil penelitian Patade *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa kisaran LD₅₀ diperoleh pada dosis 20 gy pada kalus tebu yang berumur 4 minggu setelah subkultur berdasarkan persentase kalus tumbuh.



Gambar 3. Grafik persentase penambahan bobot kalus terhadap beberapa dosis irradiasi sinar gamma.



Gambar 4. Persentase kalus yang beregenerasi terhadap beberapa dosis irradiasi sinar Gamma.

KESIMPULAN

Hasil pengamatan terhadap kalus tebu yang diiradiasi dengan beberapa dosis iradiasi sinar gamma, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Dosis iradiasi berpengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan kalus tebu.
2. Penambahan bobot kalus dan persentase kalus yang beregenerasi semakin menurun dengan kenaikan dosis iradiasi sinar gamma.
3. Dosis iradiasi lebih nyata pengaruhnya terhadap persentase kalus beregenerasi dibandingkan penambahan bobot kalus.
4. Model dosis lethal iradiasi pada kalus tebu terbaik berbentuk kuadratik, dengan persamaan berdasarkan peubah:
 - a. Penambahan bobot kalus
$$Y = 97,06 - 1,82x + 0,01x^2, LD_{20} = 10,10 \text{ gy dan } LD_{50} = 34,09 \text{ gy}$$
 - b. Persentase kalus yang beregenerasi
$$Y = 99,83 - 3,29x + 0,03x^2, LD_{20} = 6,36 \text{ gy dan } LD_{50} = 17,69 \text{ gy}$$

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, A.G. 1973. Sugarcane Physiology: A Comprehensive Study of the Saccharum Source-to Sink System. Amsterdam, Elsevier Scientific Publ. 752 p.
- Al-Safadi, B., Simon, P.W. 1996. Gamma Irradiation Induced Variation in Carrots. J. Amer Soc. Hort. Sci. 121:599-603.
- Banerji, B.K., Datta, S.K. 1992. Gamma ray induced flower shape mutation in chrysanthemum cv Java. J. Nuclear Agric. Biol. 21(2):73-79.
- Bibi, S., Khan, I.A., Bughio, H., Odhano, I.A., Asad, M.A., Khatri, A. 2009. Genetic differentiation of rice mutants based on morphological traits and molecular marker (RAPD). Pak. J. Bot., 41(2):737-743.
- Chopra, V. 2005. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. Current Sci., 89:353-359.
- Datta, S.K. 2001. Mutation studies on garden chrysanthemum: A review. Sci. Hort. 7:159-199.
- Gilbert, R.A., Gallo Meagher, M. Comstock, J.C. Miller, J.D. Jain, M. Abouzid. 2005. Agronomic evaluation of sugarcane lines transformation for resistance to sugarcane mosaic virus strain E. Crop sci.: 45:2060-2067.
- Ismachin, M. 1988. Pemuliaan Tanaman dengan Mutasi Buatan. Jakarta: Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional.
- Larik, A.S., S. Memon, Z.A. Soomro. 2009. Radiation induced polygenic mutations in *Sorghum bicolor*. J. Agric. Res. 47(1).
- Medina, F.I.S., E. Amno, S. Tano. 2005. Mutation Breeding Manual. Japan. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA).
- Patade, V.Y., P. Suprasanna. 2008. Radiation induced in vitro mutagenesis for sugarcane improvement. Sugar Tech. 10 (1):14-17.
- Patade, V.Y., P. Suprasanna, V.A. Bapat. 2008. gamma irradiation of embryogenic callus cultures and in vitro selection for salt tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Agricultural Sciences in China 7(9):1147-1152.
- Pick Kiong, A.L., A.G. Lai, S. Hussein, A.R. Harun. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 2(2):135-149.

- Singh, N.K., H.S. Balyan. 2009. Induced mutation in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) CV. Kharcia 65 for reduced plant height and improve grain quality traits. Adv. In Biol. Res. 3(5-6):215-221.
- Soeranto. 2011. Komunikasi pribadi.
- Tah, P.R., S. Saxena. 2009. Induced synchrony in pod maturity in mungbean (*Vigna radiata*). Int. J. Agric. Biol. 11(3).
- Wang, Y., F. Wang, H. Zhai, Q. Liu. 2006. Production of useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. Scientia Horticulture. 111:173-178.
- Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi Tanaman I. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Witjaksono. 2003. Bioteknologi untuk Perbaikan Tanaman Buah. Laboratorium Kultur Sel dan Jaringan Tanaman, Bidang Botani. Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu, K. Degi, T. Morishita. 2008. Effect of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breed. Sci. 58:331-335.