

Regenerasi Kalus Embrionik Padi setelah Diseleksi dengan Al dan pH Rendah

Ragapadmi Purnamaningsih dan Ika Mariska

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi nasional padi adalah dengan memanfaatkan lahan masam yang tersedia cukup luas di luar Pulau Jawa. Pada lahan tersebut ditemukan masalah cekaman lingkungan, yaitu tingkat ke-masaman yang tinggi, ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg, dan Mo yang rendah serta konsentrasi Al dan Mn yang tinggi. Pendekatan yang efisien dan ramah lingkungan untuk menanggulangi masalah tersebut adalah dengan memperbaiki kultivar-kultivar tanaman terhadap cekaman lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode seleksi yang tepat dan nomor-nomor ha-rapan baru tanaman padi yang dapat ditanam di lahan masam (pH rendah dan kandungan Al yang tinggi). Perlakuan yang diuji adalah varietas (T-309, Rojolele, dan IR64), dosis radiasi (0, 100, 300, dan 500 rad), serta konsentrasi aluminium (0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm). Seleksi dilakukan pada dua tahap, yaitu tahap kalus dan tahap regenerasi. Rancangan disusun secara fak-torial dalam Rancangan Lingkungan Acak Lengkap. Hasil penelitian menunjuk-kan bahwa peningkatan dosis radiasi dapat menyebabkan penurunan daya regenerasi kalus padi. Massa sel embrionik yang diseleksi dengan Al dan pH rendah dapat beregenerasi membentuk tunas dengan kemampuan regenerasi yang berbeda-beda untuk masing-masing varietas tergantung pada konsentrasi aluminium yang diberikan. Semakin meningkat konsentrasi Al maka semakin menurun daya regenerasi kalus membentuk tunas. Seleksi yang dilakukan pada tahap regenerasi memberikan persentase regenerasi yang lebih tinggi diban-dingkan dengan seleksi pada tahap kalus.

Kata kunci: Padi, seleksi *in vitro*, Al, pH

ABSTRACT

Using of acid land to increase national production of rice is another alternative. The main problem of the land is abiotic stress: high acidity, low availability of N, P, K, Ca, Mg, Mo and high concentration of Al and Mn. Improvement cultivars to abiotic stress. Can solve the problem. The objective of this research is to conduct selection method and new rice varieties tolerance to acid soil (low pH and high concentration of Al). The treatment was varieties (T-309, Rojolele, and IR64), dosage of radiation (0, 100, 300, and 500 rad) and aluminum concentra-tion (0, 100, 200, 300, 400, and 500 ppm). Selection done at 2 stages: callus stage and regeneration stage. Randomized Complete Design was used in this experiment. The results showed that increasing of dosage radiation could decrease callus regeneration of rice. Embryonic cell masses which selection with Al and low pH could regenerate to form shoot with different regeneration ability between varieties depend on concentration aluminum. Increase of Al concentra-tion could decrease callus regeneration ability to form shoot. Selection on regeneration stage given higher percentage of regeneration than callus stage.

Key words: Rice, *in vitro* selection, Al, pH

PENDAHULUAN

Indonesia saat ini menghadapi masalah pangan akibat peningkatan jumlah penduduk yang diikuti oleh banyaknya sawah subur di Pulau Jawa yang beralih fungsi menjadi kawasan industri dan pemukiman. Oleh karena itu, setiap tahun Indonesia selalu mengimpor beras karena produksi dalam negeri belum mampu memenuhi kebutuhan penduduk yang terus meningkat.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah memanfaatkan lahan berma-salah antara lain lahan masam yang luasnya mencapai 101,519 juta hektar (Sudjadi, 1984). Namun demikian, pada lahan masam terdapat berbagai permasa-lahan antara lain kondisi pH yang rendah sehingga menurunkan ketersediaan un-sur hara yang penting bagi pertumbuhan tanaman, di lain pihak toksisitas Al me-ningkat. Sampai saat ini belum banyak varietas yang tahan pada lahan masam dan beberapa galur masih dalam tahap pengujian.

Sebelumnya pemecahan masalah kesuburan tanah dalam produksi tanam-an ditekankan pada upaya untuk mengembalikan kesuburan tanah antara lain de-ngan pemupukan dan pengapuran. Pengapuran merupakan salah satu upaya un-tuk memperbaiki kondisi lahan masam, namun ternyata biaya yang harus dike-luarkan sangat mahal. Oleh karena itu, perlu diupayakan alternatif lain.

Keragaman genetik yang tinggi merupakan salah satu faktor utama dalam perbaikan sifat-sifat tanaman secara konvensional. Peningkatan keragaman gene-tik dapat dilakukan dengan memanfaatkan berbagai bahan genetik yang tersedia di alam dan selanjutnya dilakukan persilangan secara konvensional. Namun untuk sifat-sifat tertentu sering tidak ditemukan pada sumber gen yang ada. Karena ma-sih sempitnya keragaman genetik terhadap lahan bermasalah maka perbaikan ta-naman akan dilakukan melalui seleksi *in vitro* pada sel somatik.

Seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode untuk mendapatkan keragam-an somaklonal yang lebih efektif dan_efisien dibandingkan cara keragaman soma-klonal lainnya karena penyaringan sifat lebih diarahkan pada sifat yang diinginkan.

Perubahan genetik dapat terjadi selama periode kultur *in vitro* atau karena adanya sel-sel yang mengalami mutasi pada jaringan induknya (Ahlowalia, 1986; Evans dan Sharp, 1986). Daud (1996) menyatakan bahwa mutasi spontan pada sel somatik berkisar 0,2-3%. Keragaman tersebut dapat ditingkatkan dengan berbagai perlakuan antara lain pemberian mutagen fisik (sinar gamma) atau pemberian kondisi stres pada kumpulan sel somatik yang bersifat embriogenik. Di Cina dan Korea kombinasi kultur *in vitro* dan mutagen fisik merupakan salah satu program yang diprioritaskan untuk dikembangkan (Yunchang dan Qu, 1997; Yi, 1997). Dila-porkan pula bahwa kombinasi kedua perlakuan tersebut lebih efektif dan efisien dibandingkan perlakuan tunggal. Sedangkan hasil penelitian El-Fikio (1997) me-nunjukkan

bahwa perlakuan radiasi sinar gamma pada dosis 4 dan 5 krad dan melalui seleksi *in vitro* pada tanaman kentang menghasilkan tanaman kentang yang toleran terhadap salinitas.

Masalah yang sering dihadapi pada seleksi *in vitro* adalah sulitnya meregenerasikan massa sel yang tahan Al dan pH rendah. Ojima dan Ohira (1986) telah melakukan seleksi *in vitro* pada sel-sel wortel, akan tetapi memerlukan waktu yang lama untuk meregenerasikannya menjadi planlet. Dengan demikian, sistem regenerasi dari massa sel perlu dikuasai terlebih dahulu.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dosis radiasi optimum yang dapat meningkatkan keragaman, metode seleksi yang tepat dan nomor-nomor harapan baru tanaman padi yang tahan terhadap lahan masam (pH rendah dan kandungan Al yang tinggi).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Eksplan yang digunakan adalah benih padi varietas Taipei-309/T-309 (Japonica), Rojolele (Javanica), dan IR64 (Indica) yang merupakan varietas yang peka terhadap aluminium. Media dasar yang digunakan adalah media Murashige-Skoog (MS).

Metode

Penelitian ini terdiri atas 3 kegiatan, yaitu (1) induksi kalus embriogenik, (2) mencari kisaran dosis radiasi yang tepat untuk masing-masing varietas padi, dan (3) seleksi *in vitro* serta regenerasi eksplan setelah seleksi.

Kegiatan 1

Benih padi varietas T-309, Rojolele, dan IR64 disterilisasi dengan menggunakan beberapa sterilan antara lain alkohol dan clorox. Setelah itu, benih dikulturkan pada media kontrol MS (medium dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh). Setelah 2-3 hari embrio benih tersebut diisolasi dan ditanam pada media induksi kalus, yaitu Murashige-Skoog (MS) yang diberi 2,4-D, NAA dan BA.

Kegiatan 2

Peningkatan keragaman genetik, dilakukan dengan meradiasi kalus yang telah bersifat embriogenik. Radiasi dilakukan dengan menggunakan sinar gamma pada dosis 0-3 krad.

Kegiatan 3

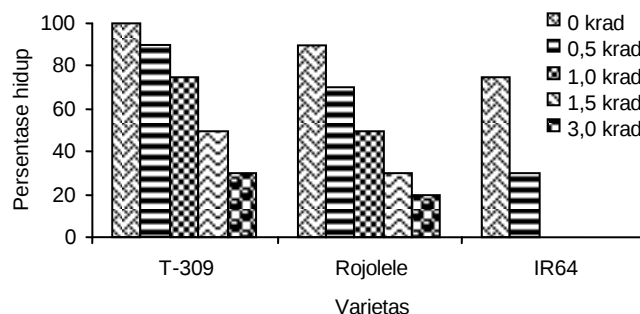
Kalus yang telah diradiasi dipindahkan pada media seleksi, yaitu media MS yang mengandung $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada beberapa taraf konsentrasi, yaitu 0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm dengan pH rendah (sekitar 4). Untuk memunculkan sifat toksisitas Al dan mempertahankan kemasaman media maka dilakukan modifikasi pada garam makro dan media dasar MS. Seleksi dilakukan pada dua tahap yang berbeda, yaitu tahap kalus dan tahap regenerasi. Seleksi pada tahap kalus dilakukan dengan cara memindahkan kalus yang telah diradiasi pada media induksi kalus yang ditambahkan komponen seleksi (Al + pH 4,0). Jadi pada seleksi tahap kalus, eksplan (kalus) diinduksi untuk tetap berdiferensiasi membentuk kalus dan dilihat kemampuan eksplan tersebut untuk tetap tumbuh dan berkembang dengan adanya komponen seleksi. Setelah 2 bulan di media seleksi kemudian kalus tersebut dipindahkan ke media regenerasi. Seleksi tahap regenerasi dilakukan dengan memindahkan kalus yang telah diradiasi pada media regenerasi dengan penambahan komponen seleksi (Al + pH 4,0). Pada seleksi tahap ini eksplan (kalus) langsung diinduksi untuk membentuk tunas tanpa menjalani tahap pembentukan kalus lebih lama. Tunas yang telah diseleksi diregenerasikan pada media regenerasi, yaitu media MS yang mengandung BA dan kinetin, kemudian dipindahkan pada media perakaran (MS + IAA 0,1 mg/l).

Peubah yang diamati adalah LD 50 untuk masing-masing varietas, persen-tase regenerasi eksplan pada seleksi tahap kalus dan regenerasi, serta penampakan visual dari biakan. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan Radiasi

Pertumbuhan kalus hasil radiasi pada umumnya terhambat. Dari Gambar 1 terlihat bahwa semakin tinggi dosis radiasi yang diberikan semakin rendah kemampuan kalus untuk hidup. LD50 untuk masing-masing varietas



Gambar 1. Pengaruh radiasi sinar gamma terhadap persentase hidup eksplan pada umur 4 minggu

padi yang digunakan berbeda-beda. LD50 untuk varietas T-309 dicapai pada kisaran dosis radiasi 1,0-1,5 krad, Rojolele pada 0,5-1,0 krad, sedangkan IR64 merupakan varietas yang sangat peka di mana LD50 dicapai pada kisaran dosis radiasi 0-0,5 krad (Gambar 1). Sedangkan pada dosis radiasi 1,0-3,0 krad tidak ada satupun kalus padi varietas IR64 yang bertahan hidup, di mana kalus tersebut berwarna hitam.

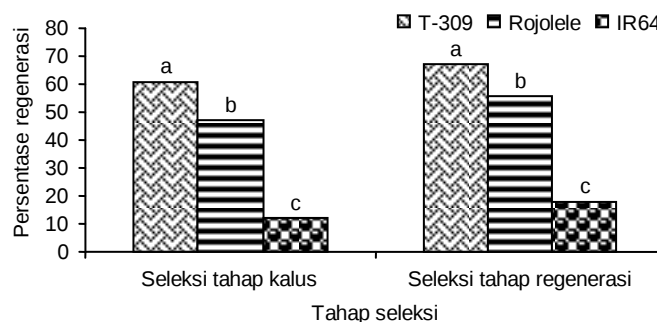
Peningkatan Ketahanan Padi terhadap Aluminium dan pH Rendah melalui Metode Seleksi *In Vitro*

Seleksi dilakukan pada dua tahapan yaitu tahap kalus dan tahap regenerasi. Hal tersebut dilakukan untuk mengantisipasi rendahnya kalus yang tetap tumbuh setelah perlakuan radiasi dan pemberian kondisi stres dengan Al dan pH rendah.

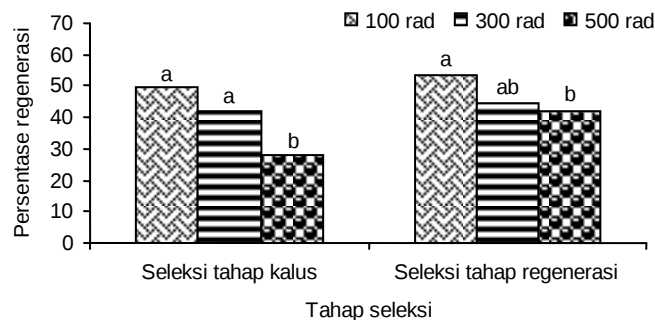
Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh interaksi antara jenis varietas, dosis radiasi dan komponen seleksi terhadap kemampuan regenerasi eksplan. Dari Gambar 2 terlihat bahwa varietas T-309 mempunyai kemampuan untuk tetap hidup yang paling tinggi dibandingkan dengan varietas lainnya, baik untuk seleksi tahap kalus maupun seleksi tahap regenerasi. Sedangkan jika dibandingkan antara kedua tahapan seleksi, ternyata persentase eksplan yang dapat beregenerasi lebih tinggi pada seleksi yang dilakukan pada tahap regenerasi. Hal ini disebabkan karena pada metode ini periode kalus yang dialami eksplan tidak begitu panjang (lama), sehingga kemampuan regenerasinya tidak menurun dengan cepat.

Tentunya hal ini akan sangat menguntungkan, akan tetapi beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa seleksi yang dilakukan pada tahap kalus walaupun menurunkan kemampuan regenerasi eksplan, namun ternyata eksplan yang dapat tumbuh mempunyai sifat ketahanan yang lebih tinggi terhadap komponen seleksi.

Hasil yang sama diperoleh pada perlakuan dosis radiasi (Gambar 3). Dosis radiasi 100 rad dan 300 rad tidak memberikan perbedaan yang nyata terhadap persentase regenerasi eksplan, baik untuk seleksi yang dilakukan pada tahap kalus maupun tahap regenerasi. Perbedaan baru terlihat jika radiasi diberikan pada dosis 500 rad. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan radiasi pada dosis 500 rad menurunkan daya regenerasi kalus. Diduga pada kondisi tersebut sel-sel mengalami mutasi yang dapat terjadi karena adanya perubahan komposisi basa dalam untai DNA akibat adanya ion radikal yang masuk ke dalam jaringan yang dapat menyebabkan perubahan susunan asam amino pada protein tertentu sehingga terjadi perubahan aktivitas enzim sesuai dengan protein baru yang terbentuk. Adanya gangguan dalam aktivitas metabolisme sel dapat menurunkan kemampuan regenerasi jaringan, namun demikian perubahan yang terjadi diharapkan dapat me-



Gambar 2. Persentase regenerasi eksplan pada tahap seleksi yang berbeda



Gambar 3. Persentase regenerasi eksplan pada beberapa dosis radiasi dan tahap seleksi

munculkan sifat-sifat baru yang menguntungkan, dalam hal ini meningkatkan sifat ketahanan terhadap Al dan pH rendah (Fikio, 1997).

Pengaruh aluminium dan pH rendah terhadap kemampuan regenerasi eksplan setelah seleksi disajikan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat ada respon yang berbeda dari kedua varietas setelah perlakuan seleksi. Semakin tinggi konsentrasi aluminium yang digunakan, maka persentase regenerasi makin rendah. Persentase regenerasi tertinggi diperoleh dari perlakuan kontrol (pH 5,8) baik untuk regenerasi pada seleksi yang dilakukan pada tahap kalus maupun regenerasi, yaitu masing-masing 60 dan 70%. Penurunan pH media menjadi 4,0 menurunkan persentase regenerasi eksplan. Penambahan Al pada beberapa taraf konsentrasi juga memperlihatkan respon yang berbeda antara kedua tahap seleksi yang digunakan serta berbeda nyata secara statistik.

Untuk seleksi yang dilakukan pada tahap kalus, penurunan pH media menjadi 4,0 dan penambahan Al 100 ppm + pH 4,0 menghasilkan persentase regenerasi yang lebih rendah daripada kontrol (pH 5,8) tetapi tidak berbeda nyata secara statistik. Perbedaan yang nyata baru terlihat setelah konsentrasi Al ditingkatkan, bahkan pada penggunaan Al sebesar 500 ppm + pH 4,0 eksplan yang dapat beregenerasi hanya 22%. Diduga hal ini disebabkan oleh semakin lamanya eksplan berada pada fase kalus di mana proses dediferensiasi terus berlangsung tanpa terjadi proses diferensiasi. Selain itu, penambahan Al ke dalam media menyebabkan terjadi ketidakseimbangan ketersediaan unsur hara karena toksisitas Al menyebabkan eksplan tidak dapat memenuhi kebutuhannya sehingga proses diferensiasi terhambat. Hal ini sejalan dengan penelitian Van Sint Jan *et al.* (1997) di mana peningkatan konsentrasi Al dapat menurunkan kemampuan regenerasi tanaman padi. Menurut Marschner (1995) aluminium dapat menurunkan daya morfogenesis eksplan karena pada inti sel Al berasosiasi dengan DNA, sehingga menghentikan proses pembelahan inti. Sedangkan pada dinding sel penghambatan terjadi karena Al menggantikan kedudukan Ca sehingga terjadi kebocoran membran.

Tabel 1. Persentase regenerasi eksplan pada beberapa konsentrasi Al dan tahap seleksi

Komponen seleksi	Regenerasi (%)	
	Tahap kalus	Tahap regenerasi
Kontrol pH 5,8	60 a	70 a
Kontrol pH 4,0	44 ab	64 ab
Al 100 + pH 4,0	48 ab	58 ab
Al 200 + pH 4,0	40 b	52 b
Al 300 + pH 4,0	32 bc	34 c
Al 400 + pH 4,0	34 bc	32 cd
Al 500 + pH 4,0	22 c	18 d

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5%

Hasil yang sama diperoleh dari seleksi yang diberikan pada tahap regenerasi, di mana semakin tinggi konsentrasi Al yang digunakan maka persentase regenerasi makin rendah. Akan tetapi jika dibandingkan dengan seleksi pada tahap kalus tampaknya pada konsentrasi Al 100-200 ppm persentase regenerasi eksplan lebih tinggi, akan tetapi pada konsentrasi Al yang lebih tinggi (400-500 ppm) persentase regenerasi eksplan lebih rendah. Kemungkinan hal ini disebabkan karena eksplan yang diberi perlakuan seleksi pada tahap kalus mengalami periode kalus yang lebih lama, sehingga dapat terjadi mutasi yang dapat mengarah kepada ketahanan terhadap komponen seleksi yang diberikan, yaitu Al dan pH rendah. Akibatnya sifat ketahanan eksplan meningkat sehingga persentase eksplan yang dapat tumbuh dan beregenerasi juga meningkat. Selain itu, penggunaan auksin seperti 2,4-D dapat menyebabkan perubahan sifat genetik. Keragaman yang ditimbulkan disebabkan oleh daya aktivitasnya yang kuat dalam memacu proses dediferensiasi sehingga kromosom tidak stabil dan mengganggu replikasi DNA (Ahlowalia, 1986). Menurut Singh *et al.* (1987) zat pengatur tumbuh merupakan faktor utama yang menyebabkan mutasi pada kultur *in vitro*.

Tunas yang berasal dari seleksi dengan Al dan pH rendah saat ini telah diakarkan dan beberapa planlet telah diaklimatisasi. Semua planlet yang diaklimatisasi dapat tumbuh dengan baik di rumah kaca.

KESIMPULAN

1. Peningkatan dosis radiasi sampai dengan 3 krad dapat menyebabkan penurunan daya regenerasi kalus padi. Varietas IR64 paling peka dibandingkan dengan varietas T-309 dan Rojolele, dosis radiasi 1-3 krad menyebabkan kalusnya menjadi coklat dan mati.
2. Dengan seleksi baik pada tahap kalus maupun tahap regenerasi daya regenerasi T-309 lebih tinggi daripada Rojolele dan IR64.
3. Massa sel embrionik yang diseleksi dengan Al dan pH rendah dapat beregenerasi membentuk tunas. Semakin meningkat konsentrasi Al maka semakin menurun daya regenerasi kalus membentuk tunas.
4. Seleksi yang dilakukan pada tahap regenerasi memberikan persentase regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan seleksi pada tahap kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlowalia, B.S. 1986.** Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. *In* J. Serial (*Ed.*). Somaclonal variation and crop improvement. Martinus Nijhoff Publisher. USA. p. 14-27.
- Daud, M.E. 1996.** Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annual review of Phytopathology 24:159-186.
- El-Fikio, A.A. 1997.** Induction of genetic variability by using gamma radiation and selection for salt tolerance *in vitro* in potato (*Solanum tuberosum*). J. Genet.&Breed. 51:309-312.
- Evans, D.A. and W.R. Sharp. 1986.** Somaclonal and gametoclonal. *In* V.A. Evans, W.R. Sharp and P.V. Ammirato (*Eds.*). Hand book of plant cell culture. Vol. 4. Mc. Millan Publ. Co. New York p. 87-132.
- Ojima, K. and K. Ohira. 1986.** Characterization and regeneration of aluminum tolerant variant from carrot cell culture. Jap. Ann. Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Sudjadi, M. 1984.** Problem soil in Indonesia and their management. *In* L. Pricharda (*Ed.*). Ecology Food and Fertility Tech. Center for Asia and Pasific Region. Taiwan.
- Van Sint Jan, V., C. Costa de Macedo, J.M. Kinet, and J. Bouharmont. 1997.** Selection of Al resistant plants from a sensitive rice cultivar using somaclonal variation, in vitro selection and hydroponic cultures. Euphytica 97:303-310.
- Yi, Le. 1997.** Development of genetic resources by *in vitro* application of radiation. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA, STA, Most and JAIF. 12-18 Oct. Suwon, Korea.
- Yunchang, Li and Qu Liang. 1997.** A review and prospect on mutation breeding of oil crops in China. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA, STA, Most and JAIF. 12-18 Oct. Suwon, Korea.