

Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Induksi Kalus dan Seleksi Tingkat Toleransi Padi (*Oryza sativa* L.) terhadap Cekaman Salinitas secara *In-Vitro*

Novita Dwi Lisdyananti*, Syaiful Anwar dan Adriani Darmawati

Laboratorium Pemuliaan dan Fisiologi Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro
Jl. Drh. R. Soejono Koesoemowardojo, Tembalang, Semarang
E-mail: lisdyanovita@gmail.com

ABSTRAK

Pemanfaatan lahan salin untuk budidaya padi perlu didukung adanya varietas padi yang toleran di lahan salin. Varietas padi ini dapat diperoleh melalui program pemuliaan tanaman salah satunya dengan metode mutasi fisik menggunakan sinar gamma. Mutasi fisik bersifat acak, sehingga perlu dilakukan seleksi. Seleksi untuk mendapatkan mutan yang toleran terhadap cekaman salinitas dapat dilakukan dengan penanaman pada media kultur yang telah dimodifikasi dengan penambahan NaCl. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengkaji pengaruh dosis iradiasi sinar gamma terhadap induksi kalus padi dan tingkat toleransinya pada media salin. Penelitian ini menggunakan 2 rancangan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) monofaktor pada tahap induksi kalus dengan faktor berupa dosis iradiasi sinar gamma (0, 100 dan 200 Gy) dan RAL faktorial pada tahap regenerasi dengan faktor berupa dosis iradiasi sinar gamma (0, 100, 200 Gy) dan faktor kedua yaitu konsentrasi NaCl (0 dan 50 mM). Metode penelitian yang digunakan yaitu iradiasi benih padi varietas Ciherang, pembuatan media kultur jaringan, sterilisasi eksplan benih padi yang telah diiradiasi, inisiasi eksplan pada media induksi kalus, subkultur ke media regenerasi yang telah dimodifikasi dengan penambahan NaCl sesuai dengan perlakuan, dan pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma dapat menghambat pertumbuhan diameter kalus dan menurunkan daya tumbuh kalus dari eksplan benih padi varietas Ciherang. Seluruh kalus yang disubkultur ke media regenerasi tidak mampu membentuk tunas dan berubah warna menjadi hitam atau mati.

Kata kunci: Cekaman Salinitas, Iradiasi, Padi

ABSTRACT

The use of saline for rice cultivation needs to be supported by tolerant rice varieties in saline land. The rice variety can be obtained through plant breeding programs, one of which is by physical mutation methods using gamma rays. Physical mutation is random mutation, so we need to do selection after that treatment. Selection to get rice mutants that are tolerant of salinity stress can be done by planting on culture media that have been modified with addition of NaCl. The purpose of this research is to examine the effect of gamma rays irradiation doses on rice callus induction and its tolerance level in saline media. This research used 2 designs, a monofactor complete randomized design at callus induction stage with a factor in the form of gamma rays irradiation doses (0, 100, and 200 Gy) and factorial complete randomized design at the regeneration stage with a factor in form of gamma rays irradiation doses (0, 100 and 200 Gy) and the second factor is NaCl concentration (0 and 50 mM). The steps of this research were irradiation of Ciherang variety rice seed, making media for tissue culture, sterilization of rice seed explants, initiation of explants in callus induction media, subculture to regenerated media that had been modified with the addition of NaCl according to treatment, and then observation. The results showed that gamma rays irradiation could inhibit the growth of callus diameter and reduce the growth of callus from explants of Ciherang variety. All callus subcultured into regeneration media are unable to form buds and turn black or die.

Keywords: Salinity Stress, Irradiation and Rice

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki garis pantai sepanjang 99.093 km yang selanjutnya mempengaruhi luasan lahan salin di Indonesia. Tanah dikatakan salin apabila memiliki Daya Hantar Listrik (DHL) lebih dari 4 deci siemens/m atau setara dengan tanah yang memiliki kandungan NaCl lebih dari 40 mM (Rachman *et al.*, 2018).

Lahan salin dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian atau untuk budidaya tanaman guna mendukung ketersediaan pangan nasional, salah satunya beras. Pemanfaatan lahan salin untuk budidaya padi perlu didukung adanya varietas padi yang toleran di lahan salin sehingga tetap dapat berproduksi secara optimal. Varietas padi tahan salin ini dapat diperoleh melalui program pemuliaan tanaman dengan metode persilangan, mutasifisik dan kimiawi, maupun transformasi genetik.

Pemuliaan tanaman dengan metode mutasi fisik dapat dilakukan dengan menggunakan sinar gamma. Energi yang dihasilkan dari sinar gamma mampu menembus jaringan tanaman. Sinar gamma dihasilkan oleh reaktor *gamma cell 2200* dengan bahan aktif berupa Co^{60} yang terus bereaksi mencapai kestabilannya. Energi yang dipancarkan tersebut dapat menyebabkan mutasi pada kromosom tanaman yaitu pemindahan atau hilangnya kromosom pada titik tertentu atau disebut mutasi titik (Lestari *et al.*, 2012). Radiasi sinar gamma merupakan jenis radiasi pengion yang dapat bereaksi dengan atom-atom atau molekul-molekul dan menghasilkan radikal bebas yang selanjutnya menyebabkan kerusakan atau modifikasi kromosom pada tanaman (Lelang *et al.*, 2015). Modifikasi kromosom ini selanjutnya akan diekspresikan dalam perubahan morfologi, anatomi, proses biokimia, maupun fisiologis tanaman.

Dampak langsung dari iradiasi sinar gamma yaitu terjadinya kematian pada sel tanaman yang diiradiasi. Persentase tingkat kematian tanaman tergantung dengan radiosensitivitas bahan yang diiradiasi. Radiosensitivitas merupakan tingkat kepekaan

bahan yang diiradiasi dengan iradiasi yang dipancarkan, sehingga jenis bahan tanaman mempengaruhi dosis iradiasi yang sesuai untuk digunakan dalam penelitian. Penelitian mengenai mutasi tanaman dapat menggunakan dosis iradiasi dibawah dosis LD_{50} , yaitu dosis iradiasi yang menyebabkan kematian 50% dari bahan tanam yang diiradiasi. Iradiasi sinar gamma pada benih padi kultivar Fajr dengan dosis 200 Gy menghasilkan persentase hidup tanaman sebesar 52,5%, sedangkan pada dosis iradiasi 220 Gy persentase hidupnya sebesar 35% (Taher *et al.*, 2011). Berdasarkan data tersebut maka penelitian iradiasi padi dapat menggunakan dosis iradiasi dibawah 200 Gy.

Perubahan-perubahan pada kromosom tanaman akibat iradiasi sinar gamma tidak dapat diprediksi karena mutasi fisik bersifat acak, sehingga perlu dilakukan seleksi lebih lanjut untuk mendapatkan individu tanaman yang sesuai dengan tujuan awal penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman padi yang toleran di media salin, sehingga perlu dilakukan seleksi sesuai dengan tujuan tersebut. Seleksi dapat dilakukan di lahan, *greenhouse*, maupun di laboratorium. Seleksi awal yang dilakukan di laboratorium dengan menggunakan teknik kultur jaringan.

Seleksi ketahanan terhadap salinitas dapat dilakukan dengan menambahkan NaCl pada media kultur sebagai representatif dari cekaman salinitas di lahan budidaya. NaCl yang terkandung dalam media tanam dapat menyebabkan penurunan tekanan turgor yang berakibat pada terhambatnya penyerapan air, nutrisi tanaman, ion K^+ dan Ca^{2+} yang berperan dalam keseimbangan osmotik pada tanaman tersebut (Sholihah dan Saputro, 2016).

Pemilihan seleksi secara *in-vitro* dilakukan karena seleksi dengan metode ini lebih cepat, tidak tergantung faktor eksternal seperti hujan dan penyinaran matahari, serta dapat menghasilkan individu tanaman dalam jumlah yang lebih banyak. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengkaji pengaruh dosis iradiasi

sinar gamma terhadap keragaman kalus padi dan toleransinya pada media salin.

2. Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni – September 2019 di Sub Laboratorium Kultur Jaringan, Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Penelitian melalui 2 tahap yaitu tahap pembentukan kalus dan tahap regenerasi. Penelitian pada tahap pembentukan kalus menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) monofaktor dengan faktor berupa dosis iradiasi sinar gamma pada taraf 0, 100, dan 200 Gy. Kalus hasil dari tahap 1 tersebut selanjutnya digunakan dalam tahap regenerasi dengan rancangan penelitian yang digunakan yaitu RAL faktorial dengan faktor berupa dosis iradiasi sinar gamma (0, 100, 200 Gy) dan Konsentrasi NaCl dalam media kultur (0 dan 50 mM).

2.1 Iradiasi Benih Padi

Iradiasi dilakukan di Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) dengan bahan tanam yang diiradiasi berupa benih padi Ciherang yang telah diletakkan dalam plastik klip. Dosis iradiasi benih padi yaitu 0, 100, dan 200 Gy sinar Gamma. Iradiasi dilakukan dengan menggunakan *Gamma Cell 2200*.

2.2 Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media kultur dilakukan dengan mencampurkan stok hara yang terdiri dari hara makro, mikro, vitamin, myoinositol, zat besi, aquades, hormon dan gula 30 g/l kemudian di stirrer hingga homogen dan disesuaikan hingga pH nya 5,8. Campuran tersebut ditambah dengan agar 8 g/l dan dipanaskan hingga mendidih. Media yang telah jadi selanjutnya dituangkan kedalam botol kultur yang telah disterilkan, setiap botol berisi ± 20 ml media kultur. Media kultur selanjutnya disterilisasi.

Media yang dibuat terdapat dua jenis yaitu media induksi kalus dan media regenerasi.

Media induksi kalus menggunakan hormon 2,4 D 2,5 mg/l sedangkan untuk media regenerasi ditambahkan hormon BAP 2,5 mg/l + NAA 1 mg/l + agen seleksi berupa NaCl sesuai perlakuan (0 mM atau 50 mM).

2.3 Sterilisasi

Sterilisasi yang dilakukan terdapat dua jenis yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah digunakan untuk sterilisasi media kultur dengan menggunakan autoclaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Sterilisasi kering digunakan untuk sterilisasi botol dan alat-alat kultur dengan menggunakan oven pada suhu 125°C selama 2 jam. Alat kultur yang disterilisasi sebelum dimasukkan kedalam oven perlu di bungkus dengan menggunakan aluminium foil agar panas dari oven merata dan pada saat dikeluarkan dari oven untuk dipindahkan ke *Laminair Air Flow* (LAF) tidak terkena debu.

2.4 Inisiasi Eksplan

Inisiasi eksplan diawali dengan tahap sterilisasi eksplan benih padi yang dilakukan sesuai dengan teknik sterilisasi yang dilakukan oleh Ubudiyah dan Nurhidayati (2013) yaitu sterilisasi benih padi dilakukan dalam 2 tahap yaitu di luar dan di dalam LAF. Sterilisasi diluar LAF dilakukan dengan cara benih padi dialiri dengan air mengalir selama 15 menit dan direndam dalam larutan sabun selama 15 menit. Sterilisasi di dalam *laminair air flow* dilakukan dengan cara benih direndam dalam alkohol 70% selama 1 – 2 menit, larutan klorok 40% selama 12 menit, dibilas dengan aquades steril, direndam dalam larutan klorok 20% selama 12 menit, dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali.

Eksplan yang telah steril selanjutnya diambil embrionya dengan memotong menggunakan scalpel kemudian diinisiasi dalam media kultur untuk pembentukan kalus. Terdapat lima eksplan dalam satu botol kultur. Botol kultur selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan *plastic wrap* dan diletakkan

di rak kultur yang gelap selama 4 Minggu Setelah Inisiasi (MSI). Pegamatan dilakukan setiap minggu.

2.5 Subkultur Kalus ke Media Regenerasi

Kalus yang berumur 4 MSI dan memiliki diameter antara 2 – 5 mm, bertekstur remah, dan berwarna putih selanjutnya dipindah ke media regenerasi. Subkultur dilaksanakan didalam LAF dengan cara kalus diambil dari media pembentukan kalus kemudian julurnya dipotong. Kalus diinisiasi kembali di media regenerasi dan diletakkan di rak kultur.

2.6 Parameter Pengamatan

2.6.1 Pembentukan Kalus

a) Persentase tumbuh kalus

Persentase tumbuh kalus dihitung setelah 4 minggu pengamatan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ tumbuh} = \frac{\text{Jumlah kalus tumbuh}}{\text{Jumlah eksplan yang diinisiasi}} \times 100x$$

b) Waktu muncul kalus

Waktu muncul kalus diamati dengan mencatat hari pertama kalus tersebut tumbuh dari eksplan yang diinisiasi.

c) Diameter kalus

Diameter kalus diukur setiap satu kali seminggu dengan menggunakan penggaris.

2.6.2 Regenerasi

a) Perubahan warna kalus

Perubahan warna kalus diamati setiap minggu dengan standar sesuai dengan penelitian Ubudiyah dan Nurhidayati (2013) seperti yang tertera dalam tabel 1.

Tabel 1.Tingkat Toleransi Kalus padi terhadap Salinitas

Diskripsi	Tingkat Toleransi
Mati (hitam), kalus berwarna coklat seluruhnya	Sangat peka
Berair, lebih dari 75% kalus	Peka

berwarna coklat	
Permukaan licin, berwarna kuning kecoklatan	Tahan
Kalus remah (friable), berwarna kuning pucat	Toleran
Kalus bersifat nodular, friable, berwarna putih kekuningan	Sangat toleran

2.7 Analisis Data

Data pada parameter induksi kalus dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf 5% untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma dan apabila ada pengaruh nyata perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Data pada parameter regenerasi yaitu data perubahan warna kalus pada tahap regenerasi disajikan secara deskriptif. Penyajian diskriptif dilakukan dengan foto dan dekripsi hasil penelitian.

3 Hasil dan Pembahasan
3.1. Pembentukan Kalus

3.1.1 Persentase Terbentuknya Kalus

Pengaruh dosis iradiasi terhadap persentase terbentuknya kalus berbeda signifikan berdasarkan analisis varian pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase terbentuknya kalus pada masing masing dosisi (0, 100, dan 200 Gy) secara berturut turut yaitu 97,19%; 94,24%; dan 62,82% seperti dalam tabel 2.

Tabel 2.Persentase Terbentuknya Kalus Padi Varietas Ciherang

Dosis radiasi (Gy)	Persentase tumbuh kalus (%)
0	97,19a
100	94,24a
200	62,82b

Keterangan : Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Terjadi penurunan persentase terbentuknya kalus seiring dengan peningkatan dosis iradiasi sinar gamma. Eksplan yang tidak mampu membentuk kalus merupakan efek dari

perlakuan yang diberikan. Efek kematian akibat sinar gamma tersebut disebut dengan efek deterministik. Efek deterministik menyebabkan kematian pada sel tanaman yang selanjutnya dapat menyebabkan tanaman menjadi mati seluruhnya. Efek deterministik ini dapat terjadi karena iradiasi sinar gamma akan membentuk radikal-radikal bebas yang bersifat racun. Hal ini sesuai dengan pendapat Lelang *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa iradiasi sinar gamma merupakan iradiasi pengion yang dapat bereaksi dengan atom dan molekul dalam bahan yang diiradiasi dan menghasilkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan pada kromosom. Nurrachmamila dan Saputro (2017) menambahkan bahwa iradiasi sinar gamma dapat membentuk radikal bebas yang mampu bereaksi dengan molekul organik (protein, lipid dan asam nukleat) sehingga secara langsung akan mengganggu metabolisme sel yang diiradiasi.

Penurunan persentase tumbuh kalus terjadi secara signifikan pada dosis iradiasi 200 Gy. Hal ini terjadi karena energi iradiasi yang diterima bahan tanam lebih besar sehingga lebih banyak terjadi kerusakan pada sel tanaman. Menurut Yunita (2012) peningkatan dosis iradiasi sinar gamma akan meningkatkan persentase kematian tanaman dengan cara menembus sel-sel meristem karena sel ini bersifat radiosensitif. Radiosensitivitas tanaman sangat bergantung pada jenis bahan tanam yang diiradiasi. Penelitian ini menggunakan bahan yang diiradiasi berupa benih padi sehingga kadar airnya tidak terlalu tinggi. Hal ini menyebabkan tidak banyak eksplan yang mati pada perlakuan 100 Gy namun efek radiasinya sangat terlihat pada dosis iradiasi 200 Gy. Berdasarkan pendapat Lelang *et al.* (2015) radiosensitivitas pada tanaman bergantung pada kadar air pada bahan yang diiradiasi, karena molekul H_2O pada bahan tanam yang diiradiasi dapat terurai menjadi H_2O^+ dan e^- yang selanjutnya dapat membentuk H_2O_2 yang bersifat racun dan mempengaruhi sistem biologis tanaman hingga menyebabkan kematian.

3.1.2 Waktu Muncul Kalus

Berdasarkan hasil analisis ragam diperoleh hasil bahwa dosis iradiasi sinar gamma tidak mempengaruhi waktu muncul kalus padi varietas Ciherang. Perbedaan hari muncul kalus pada padi varietas Ciherang tidak signifikan atau tidak berbeda nyata (tabel 3.)

Tabel 3. Rerata Waktu Muncul Kalus

Dosis Iradiasi	Rerata Waktu Muncul Kalus (Hari)
0	12,35
100	12,40
200	17,00

Waktu muncul kalus dari setiap dosis iradiasi relatif sama. Hal ini diduga terjadi karena kondisi tempat penyimpanan yang kurang gelap juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Berdasarkan dugaan tersebut, maka pada minggu ke 2 penelitian botol kultur dipindahkan ke dalam kardus dan ditutup rapat lalu di letakkan di rak kultur yang telah diberi kain hitam sehingga tidak ada cahaya yang masuk. Hal ini sesuai dengan pendapat Herawati *et al.* (2008) induksi kalus padi dilakukan dengan menyimpan botol kultur yang telah berisi eksplan padi di tempat yang gelap agar hormon auksin tidak mengalami kerusakan. Kalus padi dari eksplan benih padi ini pertama kali muncul dari embrio padi dan kemudian terus tumbuh hingga akhir pengamatan (minggu ke 4 setelah inisiasi).

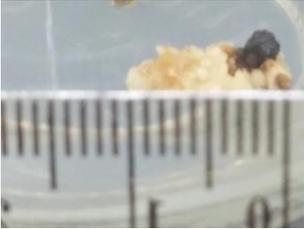
Kalus padi tanpa iradiasi (0 Gy) paling cepat tumbuh kemudian diikuti oleh kalus yang diiradiasi dengan dosis 100 Gy lalu 200 Gy. Iradiasi sinar gamma umumnya akan menghambat pertumbuhan tanaman karena bahan tanam perlu memperbaiki diri akibat dari kerusakan kromosom yang disebabkan energi yang dipancarkan sinar gamma. Menurut pendapat Yunita *et al.* (2012) iradiasi sinar gamma menyebabkan pembelahan sel terhambat dan juga dapat menyebabkan padi menjadi mati atau tidak tumbuh. Pembelahan

sel yang terhambat tersebut berpengaruh pada pembentukan kalus, sehingga kalus akan lebih lama untuk tumbuh..

3.1.3 Diameter Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa dosis iradiasi sinar gamma berpengaruh nyata terhadap diameter kalus padi (tabel 4.)

Tabel 4. Diameter Kalus Padi (*Oryza sativa* L.) Var. Ciherang

Dosis Radiasi	Rerata diameter kalus	Foto
0	3,17a	
100	2,86a	
200	1,80b	

Keterangan : Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Dosis iradiasi dapat menghambat pertumbuhan kalus padi hal ini dinyatakan dalam hasil penelitian ini bahwa terjadi penurunan diameter kalus yang seiring dengan

peningkatan dosis iradiasi. Perlakuan iradiasi sinar gamma 0 dan 100 Gy tidak terdapat perbedaan yang signifikan sedangkan pada perlakuan 200 Gy berbeda signifikan dibandingkan dengan perlakuan lain (0 dan 100 Gy). Berdasarkan pendapat Yunita *et al.* (2012) bahwa iradiasi sinar gamma pada kalus padi dapat menghambat pembelahan sel sehingga pertambahan jumlah sel mengalami penurunan. Penurunan pertambahan jumlah sel ini berpengaruh langsung terhadap diameter kalus karena diameter kalus yang bertambah sebagai indikasi bahwa kalus mengalami pertumbuhan.

Pertumbuhan kalus menjadi terhambat akibat efek iradiasi terjadi karena iradiasi akan menyebabkan kerusakan pada kromosom yang selanjutnya berpengaruh terhadap morfologi maupun fisiologi tanaman yang sifatnya dapat diturunkan kepada keturunannya atau dapat pula terjadi mutasi balik sehingga tidak diturunkan. Berdasarkan pendapat Nurrachmilla dan Saputro (2017) iradiasi sinar gamma berakibat pada penurunan sintesis sitokinin akibat terjadinya kerusakan pada mitokondria yang bersifat sangat sensitif terhadap iradiasi. Hormon sitokinin ini nantinya akan bekerjasama dengan auksin dalam menjalankan fungsinya dalam pembelahan sel yang sangat menentukan dalam pertumbuhan kalus.

Perbedaan diameter kalus secara signifikan pada dosis iradiasi 200 Gy menandakan terjadinya mutasi. Berdasarkan penelitian Taher *et al.* (2011) frekuensi mutasi tertinggi pada padi varietas Basmati diperoleh pada induksi mutagen sinar gamma dengan dosis iradiasi 200 dan 250 Gy, sedangkan pada penelitian padi beras hitam lokal yang berasal dari Sumatera Barat yang dikerjakan oleh Warman *et al.* (2015) frekuensi mutasi tertinggi diperoleh pada dosis iradiasi sinar gamma 200 Gy. Mutasi ini terjadi karena adanya perubahan dalam kromosom tanaman sehingga menampilkan hasil yang berbeda dari setiap dosis iradiasi sinar gamma. Berdasarkan pendapat Lelang *et al.* (2015) sinar gamma

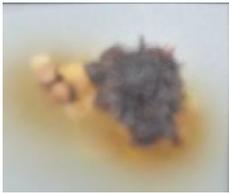
mampu melepaskan energikinetik yang besar sehingga dapat menembus jaringan tanaman dan mengubah reaksi kimia dalam sel tanaman dan menyebabkan perubahan susunan kromosom pada tanaman.

3.2 Regenerasi pada Media Seleksi

3.2.1Perubahan Warna Kalus

Berdasarkan hasil penelitian seluruh kalus mengalami perubahan warna menjadi hitam pada akhir pengamatan yaitu 8 minggu setelah inisiasi (Tabel 5.).Perubahan warna ini diawali dengan reaksi pencoklatan kemudian secara berkala menjadi hitam.

Tabel 5.Warna Kalus Padi (*Oryza sativa* L.) Var. Ciherang pada Media Seleksi NaCl

Perlakuan	Konsentrasi NaCl	
	0 mM	50 mM
0 Gy		
100 Gy		
200 Gy		

Perubahan warna terjadi pada semua perlakuan yaitu pada dosis radiasi 0, 100 dan 200 Gy serta perlakuan tanpa NaCl (0 mM) dan 50 mM NaCl. Perubahan warna ini terlihat sejak minggu ke 2 pengamatan atau 2 minggu

setelah subkultur. Perubahan warna yang terjadi diawali dengan *browning* atau pencoklatan kemudian kalus berubah menjadi hitam. Perubahan warna menjadi hitam ini menandakan bahwa kalus yang diinisiasi tidak dapat tumbuh membentuk tunas karena kalus tersebut telah mati. Kematian kalus mengindikasikan bahwa tidak diperoleh tanaman yang toleran terhadap cekaman salinitas. Hal ini berdasarkan kriteria toleransi kalus pada media salin dalam penelitian Ubudiyah dan Nurhidayati (2013) kalus yang mati pada media salin menandakan bahwa kalus tanaman tersebut sangat peka terhadap cekaman salinitas.

Penambahan NaCl memberikan cekaman salinitas pada kalus yang diinisiasi sehingga kalus memberikan respon berupa perubahan warna. Berdasarkan hasil penelitian ini agen seleksi NaCl dapat mempercepat terjadinya kematian kalus. Kalus yang ditanam dalam media seleksi dengan perlakuan dosis radiasi 0 Gy mengalami kematian pada 6 MSI, pada perlakuan dosis radiasi 100 Gy mengalami kematian pada 2 MSI dan pada perlakuan 200 Gy mengalami kematian pada minggu ke 4. Menurut Sari dan Ermavitalini (2013), NaCl pada media kultur menyebabkan sel tanaman dalam keadaan hipertonic sehingga air berpindah dari sel tanaman ke lingkungan, hal tersebut berdampak pada terhambatnya penyerapan air dan hara sehingga sel tanaman mengalami kematian yang ditandai dengan kalus menjadi hitam. Parnindi *et al.* (2016) menambahkan bahwa NaCl pada media tanam dapat menyebabkan 3 cekaman sekaligus yaitu cekaman salinitas karena adanya garam yang menyebabkan keracunan pada tanaman, cekaman kekeringan karena terhambatnya penyerapan air serta cekaman nutrisi mineral karena terhambatnya penyerapan hara. Berbagai macam cekaman yang disebabkan oleh tingginya kandungan NaCl ini dapat menyebabkan kalus mati apabila kalus tersebut tidak toleran terhadap NaCl.

Tahapan perubahan warna kalus akibat cekaman NaCl diawali dengan perubahan

warna menjadi coklat atau *browning*. *Browning* pada kalus terbentuk karena adanya senyawa fenol yang teroksidasi sehingga menyebabkan terjadinya rekasi pencoklatan kalus. Menurut Sholihah dan Saputro (2016), respon adaptif dari sel kalus yang mengalami cekaman salinitas yaitu dengan membentuk enzim oksidatif yang dapat bereaksi dengan fenol membentuk quinon yang dapat menyebabkan kalus menjadi coklat.

Proses *browning* pada kalus juga dipengaruhi oleh iradiasi sinar gamma. Iradiasi sinar gamma dapat menyebabkan kematian pada sel tanaman yang pada kalus kematian sel tanaman ini diawali dengan reaksi pencoklatan. Menurut Yunita *et al.* (2014) kalus hasil iradiasi akan mengalami degradasi enzim indolasetol dehydrogenase yang berperan dalam sintesis IAA dan akibat dari degradasi enzim ini yaitu reaksi pencoklatan pada kalus dan dapat menurunkan daya regenerasi tanaman. Hormon IAA membantu dalam proses pertumbuhan kalus, sehingga mengakibatkan pertumbuhan kalus menjadi terhambat dan mati.

Perlakuan kontrol yaitu benih tanpa iradiasi dan tanpa NaCl dalam media kultur juga mengalami perubahan warna menjadi hitam. Hal ini diduga terkait dengan faktor genetik benih padi Ciherang. Faktor genetik sangat menentukan daya regenerasi padi dalam kultur jaringan. Berdasarkan pendapat Ubudiyah dan Nurhidayati (2013) bahwa kalus padi Varietas Ciherang mengalami penurunan massa kalus yang signifikan dibandingkan dengan varietas hibrida dalam penelitian ini menggunakan varietas sembada. Penurunan massa kalus ini mengindikasikan bahwa tidak terjadi pertumbuhan dan terjadi kematian sel tanaman padi. Berdasarkan penelitian Purnamaningsih (2006), padi subspecies *indica* seperti Ciherang lebih sulit beregenerasi dibandingkan dengan padi subspecies *japonica*, hal ini diduga karena kandungan poliamin pada kalus padi subspecies *indica* lebih rendah dibandingkan dengan subspecies *japonica*. Pembelahan, dan proliferasi sel akibat

pemberian auksin berhubungan dengan kandungan poliamin dalam sel tersebut.

Seluruh kalus dari hasil iradiasi 100 dan 200 Gy sinar gamma, tidak mampu beregenerasi membentuk tunas dan akar. Hal ini diduga karena pada saat proses penembakan sinar gamma tidak mengakibatkan perubahan yang cukup besar pada sel tanaman, sehingga ekspresi yang muncul bukan dari hasil mutasi, karena terjadi persaingan antara sel mutan dengan sel non mutan dan terjadi perbaikan pada tanaman tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat Aisyah *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa mutasi tanaman dapat juga menyebabkan peristiwa *diplontic selection* kearah *recovery* atau tanaman melakukan perbaikan atau pemulihan fungsi maupun sistem enzim akibat iradiasi sinar gamma sehingga kembali dalam keadaan normal atau seperti tidak terjadi mutasi.

4 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa iradiasi sinar gamma dapat menghambatnya pertumbuhan diameter kalus dan menurunkan daya tumbuh kalus dari eksplan benih padi Varietas Ciherang. Seluruh kalus yang disubkultur ke media regenerasi tidak mampu membentuk tunas dan berubah warna menjadi hitam atau mati, sehingga tidak diperoleh tanaman yang toleran terhadap cekaman salinitas.

Daftar Pustaka

- Aisyah, S.I., H. Aswidinnoor, A. Saefuddin, B. Marwoto, dan S. Sastrosumarjo. 2009. Induksi mutasi pada stek pucuk anyelir (*Dianthus caryophyllus* Linn.) melalui iradiasi sinar gamma. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 37 (1) : 62–70.
- Herawati, R., B. S. Purwoko, N. Khumaida, I. S. Dewi dan B. Abdullah. 2008. Pembentukan galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru melalui kultur antera. *Buletin Agronomi*, 36 (3) : 181–187.

- Lelang, M. A., A. Setiadi, dan Fitria. 2015. Pengaruh iradiasi sinar gamma pada benih terhadap keragaman tanaman jenger ayam (*Celosia cristata* L.). *JurnalPertanian Konservasi Lahan Kering*, 1 (1) : 47–50.
- Lestari, N. K. D., I. A. Astarini, dan I. G. M. Oka Nurjaya. 2012. Pengaruh anatomi stomata daun lili trumpet (*Lilium longiflorum*) setelah pemaparan radiasi sinar X. *JurnalMetamorfosa*, 1 (1) : 1–5.
- Nurrachmamila, P. L. dan T. B. Saputro. 2017. Analisis daya perkecambahan padi (*Oryza sativa* L) varietas Bahbutong hasil iradiasi. *JurnalSains dan Seni ITS*, 6 (2) : 2337–2342.
- Parnindi, N. Shofianita, T. Nurhidayati. 2016. Penentuan konsentrasi kematian kalus tebu (*Saccharum officinarum*) varietas BL dan PS-862 pada seleksi *in-vitro* untuk ketahanan terhadap salinitas. *Jurnal AGRIC*, 28 (1) : 7–16.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur *in vitro*. *Jurnal Agrobiogen*, 2 (2) : 74–80.
- Rachman, A., A. Dariah dan S. Sutanto. 2018. Pengelolaan Sawah Salin Berdasar Garam Tinggi. Jakarta : Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Sari, R. L. K. dan D. Ermavitalini. 2013. Respon pertumbuhan embrio somatik kedelai (*Glycine max*) varietas agromulyo dan wilis terhadap cekaman salinitas NaCl. *JurnalSains dan Seni*, 2 (1) : 155–158.
- Sholihah, N. F. dan T. B. Saputro. 2016. Respon tanaman jagung (*Zea mays* L.) Varietas Manding terhadap cekaman salinitas (NaCl) secara *in-vitro*. *JurnalSains dan Seni*, 5 (2) : 60–66.
- Taher, H. M., M. Hafiz, J. S. Sadat, V. Cirus, N. M. Reza and M. Abbas. 2011. *Sensitivity of gamma rays studies in two iriana rice (Oryza sativa) genotypes.* *African Journal of Agricultural Research*, 6 (23) : 5208–5211.
- Ubudiyah, I. W. A. dan T. Nurhidayati. 2013. Respon kalus beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) pada kondisi cekaman salinitas (NaCl) secara *Invitro*. *JurnalSains dan Seni*, 2 (2) : 138–143.
- Warman, B. Sobrizal, I. Suliansyah, E. Swasti dan A. Syarif. 2015. Perbaikan genetic kultivar padi beras hitam lokal Sumatera Barat melalui mutasi induksi. *JurnalIlmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 11 (2) : 125–135.
- Yunita, R., E. G. Lestari dan I. S. Dewi. 2012. Regenerasi tunas dari kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi pada padi varietas fatmawati. *Berita Biologi*. 11 (3) : 359–366.