

INDUKSI MUTASI DAN SELEKSI *IN VITRO* TANAMAN GANDUM (*Triticum aestivum* L.)

Mutation Induction and *In Vitro* Selection of Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.)

Laela Sari^{1*}, Agus Purwito², Didy Soepandi², Ragapadmi Purnamaningsih³, Enny Sudarmonowati¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.

²Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.

*E-mail: laelasari@yahoo.com

ABSTRACT

The goal of this research was to produce wheat crop which is tolerant to lowland condition. Six varieties were used, Dewata, Selayar, Alibey, Oasis, Rabe and HP1744. This research consisted of 4 stages: production of the best callus on MS medium containing 3 g/L 2,4-D, induced mutation of embryogenic callus using EMS, *in vitro* selection of callus at temperature of 27–35°C, and callus regeneration. The best result for callus production was 76% for Dewata and 70% for Selayar varieties. Higher concentration of EMS and longer soaking time decreased the percentage of callus growth. LC_{50} for Dewata was 0.3% EMS at 30 minutes and that for Selayar was 0.1% EMS at 60 minutes. The higher the temperature was, the lower was the adaptation tolerant of the plants, and callus growth was inhibited. At the highest temperature (35 C) the callus did not grow at all.

Keywords: *Induced mutation, Triticum aestivum, EMS, in vitro selection, callus*

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk merakit tanaman gandum yang toleran pada dataran rendah. Varietas yang digunakan ada 6 yaitu Dewata, Selayar, Alibey, Oasis, Rabe dan HP-1744. Penelitian terdiri atas empat tahap yaitu induksi pembentukan kalus terbaik menggunakan media MS + 3 g/L 2,4-D (dipilih dua varietas yang terbaik), induksi mutasi kalus embriogenik menggunakan EMS, seleksi kalus *in vitro* pada suhu 27–35°C, dan regenerasi. Hasil induksi kalus terbaik terdapat pada varietas Dewata sebesar 76% dan Selayar sebesar 70%. Semakin tinggi konsentrasi EMS dan semakin lama waktu perendaman yang digunakan maka semakin menurun persentase pertumbuhan kalus. LC_{50} varietas Dewata adalah EMS 0,3% waktu 30 menit sedangkan LC_{50} varietas Selayar adalah EMS 0,1% waktu 60 menit. Semakin tinggi suhunya maka semakin berkurang toleran adaptasi tanaman tersebut, dan pertumbuhan kalus semakin sedikit. Bahkan pada suhu tertinggi yaitu suhu 35°C tidak ada pertumbuhan kalus sama sekali.

Kata Kunci: *Induksi mutasi, Triticum aestivum, EMS, seleksi in vitro, kalus*

PENDAHULUAN

Perbaikan tanaman gandum (*Triticum aestivum* L) perlu dilakukan karena terbatasnya sumber daya genetik gandum asal daerah tropis. Teknik *in vitro*, seperti mutasi dan seleksi *in vitro* merupakan solusi alternatif dalam memperluas variasi genetik. Kombinasi pemuliaan mutasi dan seleksi *in vitro* akan meningkatkan keragaman genetik secara lebih efektif dan efisien sehingga akan dihasilkan varietas unggul (Jain 2010). Teknik kultur *in vitro* sangat efektif dalam menginduksi mutan, karena adanya fenomena keragaman somaklonal yang terjadi dalam kultur kalus. Kultur *in vitro* yang berupa kalus juga bersifat meristematik sehingga lebih responsif terhadap radioaktif dibandingkan dengan sel-sel yang dewasa. Pembentukan kalus pada tanaman secara umum tergantung pada genotipe, tipe jaringan, ZPT dan media yang digunakan (Rashid et al. 2002). Menurut Sarker dan Biswas (2002), faktor lain yang mempengaruhi pembentukan kalus adalah pemilihan eksplan seperti embrio dewasa, embrio muda, biji, endosperm, tunas, daun dan ujung akar. Penggunaan eksplan yang tepat juga akan mempengaruhi regenerasi tanaman gandum secara *in vitro*.

Induksi mutasi secara *in vitro* pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif sangat efektif dalam mengurangi pembentukan kimera dan mempercepat seleksi *in vitro* yang dikehendaki serta meningkatkan keragaman tanaman dalam waktu singkat tanpa mengubah karakteristik tetuanya (Maluszynski et al. 1995). Penggunaan kalus yang berasal dari embrio (sel-sel tunggal) akan menghasilkan mutan yang solid dan dapat menghindari terbentuknya kimera. Salah satu mutagen yang paling potensial, paling efektif dan banyak digunakan pada berbagai jenis organisme mulai dari virus sampai mamalia adalah mutagen kimia yaitu *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS) (Medina et al. 2005). EMS sering digunakan dalam penelitian karena mudah diperoleh, murah dan tidak bersifat mutagenik setelah terhidrolisis (Van Harten 1998). Penggunaan EMS untuk meningkatkan terjadinya mutasi telah dilaporkan, diantaranya adalah untuk menghasilkan tanaman gandum yang cepat berbunga dan masaknya buah (Viswanathan

dan Reddy 1996), memperoleh tanaman gandum yang memiliki produktivitas yang tinggi dibandingkan kontrol (Sakin 2002; Sisharmini et al. 2010; Nur et al. 2012; Nur et al. 2013).

Studi menunjukkan bahwa dosis optimum dalam induksi mutasi yang dapat menghasilkan mutan terbanyak umumnya diperoleh di sekitar *lethal dose* (LD₅₀) atau *lethal concentration* (LC₅₀). Variabilitas mutan tertinggi terdapat pada mutan hasil mutagen kimia di sekitar LC₂₀ dan LC₅₀ (Datta 2001). Induksi mutasi yang dilanjutkan dengan seleksi ketahanan terhadap suhu tinggi secara *in vitro* telah dilakukan pada tanaman kentang dan bawang putih yang berhasil memperoleh mutan toleran suhu tinggi (Das et al. 2000), memperoleh pisang yang tahan penyakit layu fusarium (Sukmadjaja et al. 2013), mendapatkan kedelai produksi tinggi (Asadi 2013). Tanaman hasil regenerasi dari jaringan yang dapat mengatasi kondisi seleksi *in vitro*, diharapkan mempunyai fenotipe toleran terhadap suhu tinggi dan diharapkan dapat beradaptasi pada dataran rendah di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan mutan unggul hasil seleksi *in vitro* yang adaptif pada suhu tinggi.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *immature embryo* yang diisolasi dari biji 6 varietas gandum yaitu Selayar, HP 1744, Alibey, Dewata, Oasis dan Rabe. Media yang digunakan berupa media dasar MS yang ditambahkan ZPT. Penelitian dilakukan dalam 4 tahap yaitu: 1) Induksi pembentukan kalus embriogenik terbaik. 2) Induksi mutasi pada kalus embriogenik menggunakan EMS. 3) Seleksi *in vitro* pada suhu 27-35°C. 4) Regenerasi kalus mutan putatif hasil seleksi *in vitro*.

Induksi pembentukan kalus embriogenik

Bahan tanaman yang digunakan adalah embrio belum masak yang diisolasi dari biji gandum berumur ± 3 minggu setelah *anthesis*. Sebelum disterilisasi, biji gandum dikupas terlebih dahulu sampai bersih dan dicuci dengan akuades steril. Biji yang sudah disterilisasi diletakkan pada kertas saring

lalu diisolasi embrionya dengan cara mengeluarkan embrio dari biji. Embrio berukuran \pm 1-2 mm ditanam pada media induksi kalus dengan posisi skutelum menghadap ke atas. Media induksi kalus adalah Murashige dan Skoog (MS) yang ditambahkan 2,4-D 3 mg/L, sukrosa 3%, phytigel 3 g/L dan pH media 5.8 (Purnamaningsih 2010, tidak dipublikasi). Media yang telah ditanami embrio selanjutnya diletakkan di atas rak kultur dalam ruang kultur dalam kondisi gelap. Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan faktor tunggal yaitu varietas dengan 6 taraf yaitu Selayar, HP 1744, Alibey, Dewata, Oasis dan Rabe. Perlakuan terdiri atas 10 ulangan, masing-masing ulangan terdiri atas satu botol dengan 10 eksplan embrio. Data dianalisis menggunakan program SAS 9.1 dan jika terdapat perbedaan nyata maka analisis dilanjutkan menggunakan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5%. Pengamatan dilakukan setelah kalus berumur 2 minggu meliputi persentase pertumbuhan kalus embriogenik terbaik, dan diameter kalus. Dari 6 varietas yang diuji akan dipilih 2 varietas yang menghasilkan kalus embriogenik terbaik. Varietas terpilih tersebut akan digunakan sebagai materi uji penelitian selanjutnya.

Induksi mutasi pada kalus embriogenik

Penelitian ini dilakukan untuk mencari *Lethal concentration* 50 (LC₅₀) pada beberapa konsentrasi EMS dan waktu perendaman eksplan. Eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik dari 2 varietas terpilih dari penelitian sebelumnya. Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor yaitu konsentrasi EMS 3 taraf (0,1; 0,3; dan 0,5%) dan waktu perendaman 5 taraf (0, 30, 60, 120, dan 180 menit) untuk setiap varietas. Perlakuan terdiri atas 5 ulangan, masing-masing ulangan terdiri satu botol dengan 5 kalus. Pengamatan dilakukan setelah kalus berumur 1 minggu meliputi jumlah kalus yang masih hidup. Kalus berukuran sekitar 0,5 × 0,5 × 0,5 cm³ direndam dalam larutan EMS yang telah disterilisasi menggunakan *millipore* 0,2-0,4 μ menggunakan metode Sakin (2002) yang telah di modifikasi. Setelah diberi perlakuan EMS, kalus dicuci menggunakan akuades steril 3 kali dan kalus

dikeringkan di dalam cawan petri yang telah di isi dengan kertas saring. Kalus ditanam pada media MS dengan menambahkan 2,4-D 3ml/L, dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 1 minggu. Konsentrasi letal dapat dihitung dengan pendekatan LC₅₀ yaitu konsentrasi EMS yang menyebabkan kematian 50% eksplan. Pengamatan dilihat dari eksplan yang masih hidup pada konsentrasi LC₅₀. Penentuan LC₅₀ menggunakan Analisis Probit.

Seleksi kalus secara *in vitro*

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya yaitu melakukan seleksi kalus pada 2 varietas terpilih dari konsentrasi EMS dan waktu perendaman yang menghasilkan LC₅₀ pada suhu perlakuan. Umur kalus yang optimal digunakan dalam seleksi *in vitro* sekitar 4 minggu (Hsissou dan Bouharmont, 1994). Eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 2 minggu. Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan faktor tunggal yaitu suhu dengan 5 taraf (27; 29; 31; 33; 35°C) untuk setiap varietas. Perlakuan terdiri atas lima ulangan, dimana masing-masing ulangan terdiri satu botol dengan lima kalus. Data dianalisis varian menggunakan program SAS 9.1 dan jika terdapat perbedaan nyata maka analisis dilanjutkan menggunakan DMRT pada taraf 5%. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kalus yang hidup. Kalus yang tahan dianggap sebagai kalus mutan putatif.

Regenerasi kalus hasil seleksi *in vitro*

Penelitian dilakukan untuk memperoleh formulasi media yang tepat untuk meregenerasikan dua varietas kalus mutan putatif hasil seleksi pada penelitian sebelumnya. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap faktor tunggal yaitu formulasi media dengan 7 taraf sebagai berikut:

1. MS + tanpa ZPT (kontrol) (RG0).
2. MS + Kinetin 2 mg/L + Tyrosin 0.05 g/L + Sorbitol 6% + Sukrosa 3% (RG1).
3. MS + BA 0.1 ml/L + Kinetin 2 mg/L + Tyrosin 0.05 g/L + Sorbitol 6% + Sukrosa 3% (RG2).
4. MS + BA 0.5 ml/L + Kinetin 1 mg/L + Tyrosin 0.05 g/L + Sorbitol 6% + Sukrosa 3% (RG3).
5. MS + Kinetin 2 mg/L + Tyrosin 0.05 g/L +

- Sorbitol 6% + tanpa Sukrosa (RG4).
6. MS + BA 0,1 ml/L + Kinetin 2 mg/l + Tyrosin 0.05 g/L + Sorbitol 6% + tanpa Sukrosa (RG5).
 7. MS + BA 0.5 ml/L + Kinetin 1 mg/L + Tyrosin 0.05 gr/l + Sorbitol 6% + tanpa Sukrosa (RG6).

Setiap perlakuan terdiri atas lima ulangan, masing-masing ulangan terdiri satu botol dengan lima kalus. Botol diinkubasi dalam ruang terang dengan penyinaran lampu neon selama 16 jam. Data dianalisis menggunakan program SAS 9.1 dan jika terdapat perbedaan nyata maka analisis dilanjutkan menggunakan DMRT pada taraf uji 5%. Pengamatan yang diamati adalah persentase eksplan membentuk tunas, dan persentase eksplan membentuk akar. Pengamatan diamati pada bulan ke dua, dan diaklimatisasi setelah membentuk planlet.

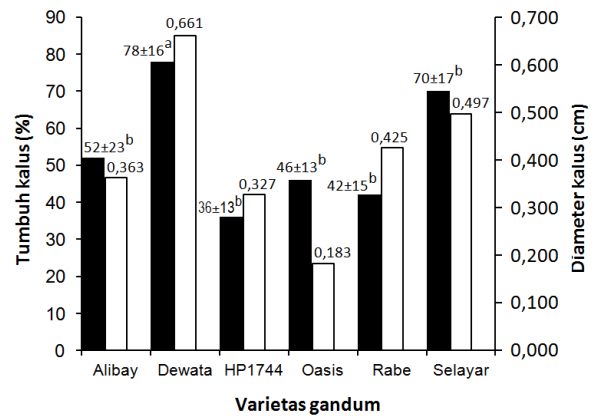
HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi pembentukan kalus embriogenik

Rerata waktu pembentukan kalus terjadi pada hari ke 7 setelah diinkubasi. Hasil penelitian ini sesuai dengan pengamatan Satyavathi et al. (2004) yang menggunakan embrio muda dari varietas Ben, Munich, Lebsock dan Maier pada berbagai media induksi kalus yang membutuhkan waktu antara 3 - 7 hari setelah induksi (HSI). Sedangkan menggunakan embrio dewasa pada media konsentrasi 2,4-D 2mg/L dengan penambahan berbagai konsentrasi sorbitol menghasilkan waktu pembentukan kalus antara 3-7 HSI (Hassan et al. 2009).

Hasil analisis persentase pembentukan kalus proembrio beberapa varietas dari eksplan embrio belum masak sangat bervariasi. Pembentukan kalus dapat menghasilkan kalus proembriogenik pada ke enam varietas tersebut. Hasil menunjukkan bahwa pembentukan kalus yang terendah (36%) pada HP1744 sampai yang tertinggi (78%) pada Dewata (Gambar 1).

Hal ini sesuai dengan penelitian induksi kalus dari gandum varietas Durum dan regenerasi kalus dari gandum lokal (Sarker dan Biswas 2002) yang menyimpulkan bahwa asal eksplan dari embrio belum masak mempunyai persentase pembentukan kalus dan regenerasi tunas



Gambar 1. Persentase pertumbuhan kalus (■) dan diameter kalus (□) dari beberapa varietas gandum di media MS+ 2,4-D 3 mg/L umur 2 minggu.

tanaman tertinggi dibandingkan eksplan dari embrio masak. Hal ini dikarenakan kalus yang diperoleh dari embrio belum masak sangat potensial digunakan untuk regenerasi tunas menjadi tanaman lengkap. Begitu juga dengan penelitian Yasmin et al. 2009, yang menggunakan embrio belum masak pada varietas Khirman yang menghasilkan induksi kalus tertinggi. Sehingga hasil persentase tertinggi pada penelitian ini dipilih dua varietas yang mempunyai persentase tumbuh kalus proembriogenik terbaik yaitu varietas Dewata sebesar 76% dan Selayar sebesar 70% (Gambar 1).

Keberhasilan pembentukan kalus tiap varietas berbeda-beda akibat perbedaan eksplan, genotipe, asal genotipe dan adaptasi di lingkungan target (Sarker dan Biswas 2002). Dewata dan Selayar mempunyai persentase pembentukan kalus tertinggi dari ke enam varietas karena dua varietas tersebut sudah di lepas di Indonesia pada tahun 2003-2004.

Hasil analisis menunjukkan bahwa pengamatan diameter kalus gandum pada semua varietas memberikan pengaruh yang nyata di media MS dengan penambahan 2,4-D 3 mg/L pada pengamatan 2 MSI. Keragaman diameter kalus menunjukkan perbedaan tiap varietas gandum dari yang terendah (0,18 cm) pada Oasis sampai yang tertinggi (0,66 cm) pada Dewata (Gambar 1).

Induksi mutasi pada kalus embriogenik

Kalus embriogenik gandum varietas Dewata dan Selayar diinduksi dengan menggunakan EMS telah menghasilkan *Lethal concentration* 50 (LC₅₀) yang

Tabel 1. Hasil analisis probit LC₂₀-LC₅₀ pada varietas Dewata dan Selayar

Peluang	Varietas Dewata			Varietas Selayar		
	Konsentrasi			Konsentrasi		
	0,10%	0,30%	0,50%	0,10%	0,30%	0,50%
	Perkiraan waktu (menit)			Perkiraan waktu (menit)		
,500	124,589	96,962	37,580	131,985	111,551	33,686
,550	117,363	87,436	32,674	121,961	97,472	29,283
,600	110,020	77,756	27,688	111,775	83,167	24,808
,650	102,430	67,752	22,535	101,248	68,381	20,184
,700	94,432	57,208	17,104	90,154	52,799	15,310
,750	85,801	45,830	11,244	78,181	35,984	10,051
,800	76,190	33,160	4,718	64,849	17,259	4,194

optimum. LC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan 50% dari kalus yang diperlakukan EMS dapat tetap hidup dan berkembang serta dapat diregenerasikan. Tingkat sensitivitas suatu jaringan terhadap konsentrasi EMS dapat diketahui melalui perendaman EMS. Penentuan konsentrasi yang tepat berdasarkan waktu perendaman EMS sangat penting untuk menentukan keberhasilan perolehan varian mutan yang diinginkan. Semakin lama perendaman dan tinggi konsentrasinya maka semakin sedikit kalus yang dapat bertahan hidup dan semakin berwarna coklat kalusnya.

Hasil pengamatan pertumbuhan kalus varietas Dewata dan Selayar menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi EMS yang dipakai dalam perendaman kalus gandum maka waktu yang diperlukan semakin kecil (Tabel 1).

Varietas Dewata dengan konsentrasi terendah 0,1% membutuhkan waktu 76,190 menit, konsentrasi tertinggi 0,5 % membutuhkan waktu 4,178 menit. Sedangkan Selayar konsentrasi 0,1% membutuhkan waktu 64,849 menit, konsentrasi tingginya 0,5% membutuhkan waktu yang singkat yaitu 4,194 menit (Tabel 1).

Kalus yang mengalami kerusakan akan menurunkan kemampuan regenerasi serta mematikan sel sehingga tidak mampu beregenerasi (Sarker dan Biswas. 2002). Peningkatan konsentrasi EMS dan waktu perendaman biasanya menghambat pertumbuhan sel-sel dan pada akhirnya akan mengakibatkan kematian sel.

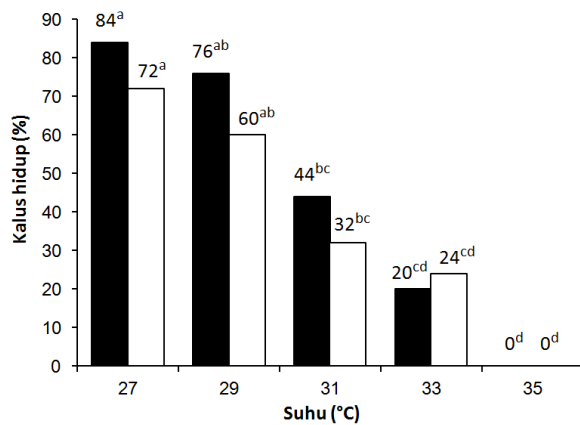
Menurut penelitian Sarker dan Biswas (2002), aplikasi EMS dapat mempengaruhi terjadinya penghambatan pada pembelahan sel. Penghambatan pada sel secara

berturut-turut akan mengakibatkan terjadinya kematian sel tanaman karena mutagen kimia secara langsung, yaitu melalui perendaman yang bersifat toksik sehingga mengakibatkan sel tidak mampu berpoliferasi membentuk tunas.

Konsentrasi EMS yang dibutuhkan untuk menimbulkan keragaman pada setiap tanaman berbeda-beda tergantung dari varietas dan jenis eksplan yang digunakan misalnya pada tanaman gandum (biji) varietas B936 konsentrasi EMS adalah 0,7% (Ndou et al. 2013). Pada penelitian ini konsentrasi EMS yang digunakan pada varietas Dewata adalah 0,3% dengan waktu perendaman 30 menit, sedangkan konsentrasi EMS yang optimal pada varietas Selayar lebih rendah yaitu 0,1% dengan waktu yang lebih lama yaitu 60 menit (Tabel 1).

Tingkat reduksi pertumbuhan kalus varietas Dewata sebesar 20% (LC₂₀) didapat pada konsentrasi 0.3% dengan waktu ± 30 menit (33,160). Tingkat reduksi pertumbuhan kalus varietas Selayar sebesar 20% (LC₂₀) didapat pada konsentrasi 0.1% dengan waktu ± 60 menit (64,849) (Tabel 1).

Hasil analisis probit menunjukkan bahwa reduksi pertumbuhan kalus gandum varietas Dewata sebesar 20-50% (LC₂₀-LC₅₀) berada pada kisaran 0,3% dengan waktu 33,180-96,962 menit, sedangkan pada varietas Selayar reduksi pertumbuhannya berada pada kisaran 0,1% dengan waktu 64,849-131,985 menit (Tabel 1). Secara teoritis, pada kisaran LC tersebut dapat menghasilkan keragaman mutan yang tinggi. Kisaran waktu yang diperlukan dalam LC yang diperoleh dari penelitian ini sangat rendah dibandingkan dengan penelitian Sakin (2002); Sakin dan Yildirim (2004),



Gambar 2. Persentase kalus Dewata (■) dan Selayar (□) yang hidup pada suhu 27°C-35°C

yang menghasilkan variabilitas genetik gandum yang tinggi dan mendapatkan varietas unggul pada kisaran 0,1 dan 0,3 dengan waktu perendaman 8 jam pada biji gandum varietas Gediz-75. Kisaran konsentrasi yang dihasilkan pada varietas Dewata adalah 0,3% dengan waktu 30 menit, dan varietas Selayar kisarannya adalah 0,1% dengan waktu 60 menit. Konsentrasi dan waktu tersebut merupakan kisaran yang tepat untuk menghasilkan keragaman mutan (Tabel 1).

Seleksi kalus secara *in vitro*.

Keragaman genetik yang ditimbulkan oleh induksi mutasi dengan EMS bersifat acak, sehingga diperlukan seleksi *in vitro* guna mendapatkan mutan yang diinginkan. Kalus varietas Dewata dan Selayar yang diseleksi pada suhu 35°C mengalami penghambatan proliferasi, dan kematian sel, sehingga kalus yang diseleksi berwarna coklat kehitaman dan tidak dapat bertahan hidup. Hal ini menunjukkan bahwa suhu 35°C memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan kalus, dan penghambatannya semakin besar dengan meningkatnya suhu seleksi. Kalus yang diseleksi pada suhu 27°C mempunyai persentase pertumbuhan kalus yang tertinggi yaitu 84% dan 72% (Gambar 2). Kalus yang tahan terhadap suhu seleksi dapat tumbuh dan menghasilkan bakal tunas bila ditumbuhkan pada media regenerasi.

Varietas Dewata mempunyai toleran adaptasi pada suhu 27°C dan semakin tinggi suhu maka semakin berkurang toleransi adaptasi tanaman tersebut. Berkurangnya toleransi adaptasi pada tanaman tersebut

akibat adanya cekaman yang ditimbulkan oleh suhu. Nilai persentase pertumbuhan kalus pada suhu 27, 29, 31, 33 dan 35°C berurutan yaitu 84; 76; 44; 20; 0% (Dewata) dan 72; 60; 36; 24; 0% (Selayar). Semakin tinggi suhu seleksi maka semakin sedikit kalus yang dapat bertahan hidup. Bahkan pada suhu tertinggi yaitu 35 C, tidak terdapat kalus yang hidup. Menurut Carver (2009), gandum memerlukan suhu sekitar 15-25°C bagi pertumbuhannya dan tidak dapat tumbuh pada daerah yang hangat dan suhu tinggi. Kenaikan 1°C saja akan membuat gandum mengalami penghambatan pertumbuhan.

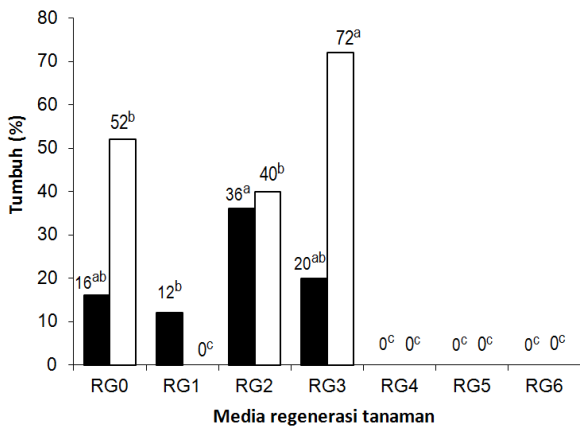
Regenerasi kalus hasil seleksi *in vitro*.

Regenerasi pada kalus gandum ini sangat sulit untuk mendapatkan tunas yang banyak, dalam satu kalus hanya menghasilkan 1-2 tunas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hassan et al. (2009) bahwa kultur jaringan tanaman monokotil family gramine relatif lebih sulit untuk diregenerasikan dibandingkan tanaman dikotil. Shah et al. (2009), melaporkan bahwa eksplan monokotil sulit diregenerasikan karena tidak memiliki kambium. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa formulasi media berpengaruh secara nyata terhadap pembentukan tunas dan pembentukan akar baik pada varietas Selayar maupun Dewata.

Persentase tumbuh tunas varietas Selayar dan Dewata tertinggi dihasilkan pada media RG2 (MS + BA 0,1 ml/L + kinetin 2 mg/L + Tyrosin 0.05 g/L + Sorbitol 6% + Sukrosa 3%) yaitu 36% dan 44%. Berikutnya diikuti oleh media RG3 20% dan 28%, media RG0 16% dan 24%, media RG1 12% dan 20% (Gambar 4 dan 5).

Formulasi media RG2 diduga memiliki konsentrasi yang optimum untuk pembentukan tunas. Penelitian ini sesuai dengan hasil Sarker dan Biswas (2002) yang menyatakan bahwa formulasi media optimal untuk regenerasi kalus gandum dari eksplan *immature* embrio menjadi tunas yaitu media MS + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin + 25 mg/L Tyrosin.

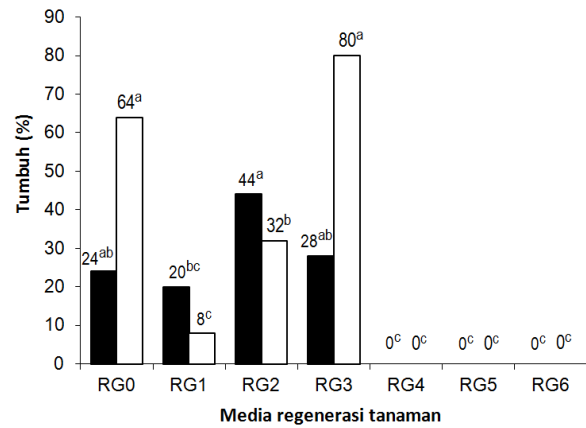
Media RG4, RG5 dan RG6 tidak menghasilkan tunas dan akar baik pada varietas Dewata maupun Selayar. Pada media tersebut kalus berubah warna menjadi putih, dan tidak ada tanda-tanda kehidupan,



Gambar 3. Persentase tumbuh tunas (■) dan akar (□) pada kalus Selayar di berbagai macam media

sampai umur 12 minggu. Media RG4, RG5 dan RG6 tidak ditambahkan gula pada formulasi ini. Gula merupakan sumber karbohidrat untuk tanaman sehingga dapat tumbuh dan berkembang, tanpa gula tidak akan ada energi. Hasil percobaan ini menyimpulkan gula tetap dibutuhkan dalam media untuk pertumbuhan tanaman. Diketahui bahwa sukrosa lebih mudah diserap oleh tanaman dibandingkan gula alkohol (sorbitol). Penambahan sorbitol juga diharapkan agar tunas tumbuh dengan cepat. Menurut George dan Sherrington (1984), sukrosa merupakan sumber karbon penting yang digunakan sebagai penyusun sel, seperti untuk pembelahan sel, pembesaran sel dan diferensiasi sel.

Pada penelitian ini tunas mulai tumbuh pada minggu ke 3 setelah muncul spot hijau pada minggu ke 1. Penelitian ini sejalan dengan hasil laporan Hassan et al (2009), bahwa gandum varietas Inwafaq-2001, Inqilab-91 dan Auqab-2002 dapat menghasilkan tunas pada minggu ke 4 di media MS yang ditambahkan sorbitol, sedangkan pada media tanpa sorbitol memerlukan waktu lebih dari 4 minggu. Penambahan sorbitol telah memberikan kekuatan untuk regenerasi tanaman sehingga hanya tanaman yang toleran yang dapat beregenerasi. Media yang ditambahkan sorbitol berfungsi untuk meningkatkan regenerasi tanaman dan meningkatkan efisiensi penggunaan media MS. Penambahan sorbitol di dalam media regenerasi digunakan untuk menyeleksi tanaman yang toleran dan dapat beradaptasi sehingga bisa tumbuh menjadi tanaman



Gambar 4. Persentase tumbuh tunas (■) dan akar (□) pada kalus Dewata di berbagai macam media

lengkap yang siap diaklimatisasi. Pada media RG2 menghasilkan jumlah tunas tertinggi dan dapat tumbuh menjadi tanaman lengkap.

Persentase kalus yang berakar paling banyak dihasilkan pada varietas Selayar dan Dewata pada media RG3 (MS + BA 0,5 ml/L + Kinetin 1 mg/L + Tyrosin 0,05 g/L + Sorbitol 6% + Gula 3%) yaitu 72% dan 80% (Gambar 3 dan 4). Berikutnya diikuti oleh media RG0 yaitu 40% dan 64%. Setelah itu media RG2 dengan nilai 32% (Selayar) dan 40% (Dewata). Terakhir media RG1 dengan nilai 8% (Dewata), sedangkan pada varietas Selayar media RG1, RG4, RG5 dan RG6 tidak ada yang berakar. Varietas Dewata hanya 3 media yang tidak berakar yaitu RG4, RG5 dan RG6.

Kecenderungan media RG3 membentuk kalus banyak akar (kalus rhizogenik) dan sedikit membentuk tunas diduga karena berkaitan dengan interaksi antara varietas dan ZPT yang ditambahkan pada media RG3. Menurut Purnamaningsih (2006) kalus rhizogenik adalah kalus yang lebih cepat membentuk akar daripada tunas. Biasanya rhizogenesis terjadi pada kombinasi perlakuan media yang mengandung auksin lebih tinggi daripada sitokinin (George dan Sherrington, 1984). Dalam hal ini tidak demikian, walaupun tidak ada penambahan auksin dalam media RG3 tetapi kalus membentuk akar terlebih dahulu dan semakin lama semakin banyak. Hal ini diduga karena hormon auksin endogen dalam tanaman gandum sangat tinggi sehingga dapat menginduksi jumlah akar terbentuk sangat banyak (Gambar 3 dan 4).

KESIMPULAN

Kalus embriogenik yang memberikan respon tertinggi adalah kalus varietas Dewata dan Selayar karena sudah beradaptasi di Indonesia. Peningkatan dosis EMS dan waktu perendaman pada kalus embriogenik menghambat pertumbuhan kalus. Semakin tinggi dosis EMS yang diberikan maka semakin sedikit kalus yang dapat hidup. Seleksi *in vitro* yang menghasilkan kalus tertinggi adalah pada suhu 27°C. Formulasi media terbaik untuk regenerasi adalah media RG2 (MS + BA 0.1 ml/L + kinetin 2 mg/L + Tyrosin 0.05 gr/L + Sorbitol 6% + Gula 3%) yaitu 44% (Dewata) dan 36% (Selayar).

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih diucapkan kepada Kepala BB-Biogen atas izin dan fasilitas yang diberikan serta Konsorsium Gandum dengan judul Perakitan Gandum Adaptif Tropis melalui Keragaman Somaklonal tahun anggaran 2012-2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadi (2013) Pemuliaan mutase untuk perbaikan terhadap umur dan produktivitas pada kedelai. *J Agrobiogen* 9:135-142
- Carver BF (2009) *Wheat science and trade*. Edition First. Wiley Blacwell Publising. USA. P.569
- Das A, Gosal SS, Sidhu JS, Dhaliwal HS (2000) Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Eupytica* 114:205-209
- Datta SK (2001) Mutation studies on garden chrysanthemum: A review. *Sci Hort* 7:159-199
- George EF, Sherrington TD (1984) *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics, England
- Hassan M, Ahmed Z, Munir M, Malik SI, Shahzad K (2009) Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African J Biotech* 8:6529-6535
- Hsissou D, Bouharmont J (1994) *In vitro* selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf). *Agronomie* 2:65-70
- Jain SM (2010) Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Rom Biotech Lett* 15:88-94
- Maluszynski M, Ahloowalia BS, Sigurbjomsson B (1995) Application *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315
- Medina FIS, Amano E, Tano S (2005) *Mutation Breeding Manual*. Japan. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA)
- Ndou VN, Shimelis H, Odindo A, Modi AT (2013) Response of selected wheat genotypes to ethylmethanesulphonate concentration, treatment temperature and duration. *Sci Res Essays* 8:189-196. doi: 10.5897/SRE12.543
- Nur A, Azrai M, Subagio H, Soeranto, Ragapadmi, Sustiprajitno dan Trikoesoemaningtyas (2013) Perkembangan pemuliaan gandum di Indonesia. *IPTEK Tanaman Pangan* 8:97-105
- Nur A, Trikoesoemaningtyas, Khumaida N, Yahya S (2012) Evaluasi dan keragaman genetik galur gandum introduksi (*Triticum aestivum* L) di agroekosistem tropis. *J Agrivigor*. 11:230-243
- Purnamaningsih R (2006) Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur *in vitro*. *J AgroBiogen* 2:74-80
- Rashid H, Ghani RA, Chaudhry Z (2002) Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology* 1:49-54
- Sakin MA (2002) The use of induced micro mutation for quantitative characters after EMS and gamma ray treatments in durum wheat breeding. *Pak J App Sci* 2:1102-1107
- Sakin MA, Yildirim A (2004) Induced mutations for yield and its components in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Food Agric & Environ* 2:285-290
- Sarker RH, Biswas A (2002) *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of

- wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Tissue Cult 12:155-165
- Satyavathi VV, Jauhar PP, Elias EM, Rao MB (2004) Effect of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. Crop Sci 44:1839-1846
- Shah MM, Khalki Q, Khan UW, Shah SAH, Shah SH, Hassan A, Perver A (2009) Variation in genotypic responses and biochemical analysis of callus induction in cultivated wheat. Gen Mol Res 8:783-793
- Sisharmini A, Aniversari A, Sustiprijatno (2010) Induksi kalus dan regenerasi beberapa genotype gandum (*Triticum aestivum* L) secara *in vitro*. J AgroBiogen 6:57-64
- Sukmadjaja D, Purnamaningsih R, Priyatno TP (2013) Seleksi *in vitro* dan pengujian mutan tanaman pisang ambon kuning untuk ketahanan terhadap penyakit layu fusarium. J Agrobiogen 9:66-76
- Van Harten AM (1998) Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge University, New York, pp 342-353
- Viswanathan P, Reddy VRK (1996) Genetics of early flowering mutants in triticale. Acta Agronomica Hungaria. 46:389-391
- Yasmin S, Khan IA, Khatri A, Seema N, Nizamani GS, Arain MA (2009) *In vitro* plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak J Bot 41:2869-2876